



BREVET D'INVENTION

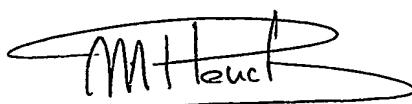
CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 AVR. 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets



Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE**

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

BREVET D'INVENTION

Code de la propriété intellectuelle-livreVI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

DATE DE REMISE DES PIÈCES: 24 AVR 2002 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: 0205173 DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: 75 DATE DE DÉPÔT: 24 AVR. 2002	Alain CATHERINE CABINET HARLE ET PHELIP 7, rue de Madrid 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: N729FR	

1 NATURE DE LA DEMANDE

Demande de brevet

2 TITRE DE L'INVENTION

PRODUIT D'EXPRESSION D'UN ADN CODANT UNE PROTEINE E7 MUTEE
DE HPV-16, COMPOSITION IMMUNOGENE CONTENANT LEDIT PRODUIT
D'EXPRESSION ET SON PROCEDE DE PREPARATION

3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE

Pays ou organisation Date N°

4-1 DEMANDEUR

Nom NEOVACS
Rue 59, Avenue Victor Hugo
Code postal et ville 75016 PARIS
Pays France
Nationalité France
Forme juridique Société anonyme

5A MANDATAIRE

Nom CATHERINE
Prénom Alain
Qualité CPI: bm [92-1045 i]
Cabinet ou Société CABINET HARLE ET PHELIP
Rue 7, rue de Madrid
Code postal et ville 75008 PARIS
N° de téléphone 0153046464
N° de télécopie 0153046400
Courrier électronique cabinet@harle.fr

6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS

	Fichier électronique	Pages	Détails
Description	desc.pdf	58	
Revendications	V	4	
Dessins		16	23 fig., 3 ex.
Abrégé	V	1	
Listage de séquences			
Rapport de recherche			

8 RAPPORT DE RECHERCHE				
Etablissement immédiat	Devise	Taux	Quantité	Montant à payer
9 REDEVANCES JOINTES				
062 Dépôt	EURO	35.00	1.00	35.00
063 Rapport de recherche (R.R.)	EURO	320.00	1.00	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème	EURO	15.00	13.00	195.00
Total à acquitter	EURO			550.00
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE				
Signé par	Alain CATHERINE 			

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention se rapporte au domaine de la prévention ou du traitement de certains cancers associés à une infection par le Papillomavirus de type HPV-16.

5

ART ANTERIEUR

Plusieurs espèces de papillomavirus humain, ou HPV, sont considérées aujourd'hui comme les agents causals de cancers. En particulier, les HPV de types 16, 18, 31, 33 et 51 sont fréquemment 10 associés aux cancers ano-génitaux, y compris le cancer du col utérin de la femme.

Plus de 50% des carcinomes squameux du col utérin sont associés au papillomavirus HPV de type 16.

Les oncoprotéines virales E6 et E7 de HPV sont fortement 15 impliquées dans les mécanismes moléculaires par lesquels ces virus contribuent au développement de ces cancers. Ces deux oncoprotéines agissent en inactivant les régulateurs du cycle cellulaire que constituent la protéine p53 et la protéine du rétinoblastome, provoquant ainsi l'événement initiateur de la progression à étapes multiples vers le cancer.

20 En général, les tumeurs malignes sont constituées de cellules cancéreuses porteuses d'antigènes associés (TAA) ou d'antigènes spécifiques (TSA) et d'un micro-environnement stromal particulier, caractérisées par une hypervascularisation, ou néoangiogénèse, qui peut être accompagnée d'une paralysie des cellules immunitaires, c'est-à-dire à 25 un état d'immunosuppression. Initialement, l'immunosuppression reste localisée au niveau de la tumeur, puisque l'individu est encore capable de se défendre contre les autres agressions telles que des infections.

Cependant, avec la dissémination métastatique, 30 l'immunosuppression peut s'étendre et se généraliser, comme l'atteste la fragilité aux infections du cancéreux au stade terminal . Cette immunosuppression met en jeu des facteurs paralysants qui sont produits par les cellules cancéreuses ou par les cellules de leur environnement. La paralysie locale des cellules du système immunitaire, ou immunosuppression, représente donc une arme majeure des cellules cancéreuses qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte.

Cet état d'immunosuppression a aussi été observé dans les cancers provoqués par une infection par HPV-16. Cette immunosuppression constitue aujourd'hui un obstacle technique majeur dans la mise au point de compositions vaccinales préventives ou curatives à l'encontre des cancers provoqués par une infection par HPV-16. En effet, les stratégies vaccinales anti-HPV-16 actuelles privilégient l'induction d'une prolifération de cellules T-cytotoxiques reconnaissant spécifiquement certains antigènes produits par HPV-16, en particulier les protéines E6 et E7, lorsqu'ils sont associés aux antigènes de classe I du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) à 5 la surface membranaire des cellules cancéreuses infectées.

10 Certains auteurs ont associé l'immunosuppression observée dans des cancers provoqués par HPV-16 à l'observation de niveaux d'expression réduits des molécules de classe I du MHC à la surface des cellules cancéreuses du col utérin (Cruz et al., 1999), ou encore à une réduction de 15 l'expression de la chaîne delta du récepteur des cellules T (TCR) chez des patients exprimant une dysplasie pré-néoplasique (Muderspach et al., 2000). D'autres auteurs ont associé l'état d'immunosuppression à un défaut de réponse des cellules T à d'éventuels signaux produits par les cellules tumorales et transmis aux cellules immunitaires en provoquant leur 20 apoptose, par exemple du fait d'une interaction Fas/Fas-ligand (Schoell et al., 1999).

D'autres auteurs ont observé que l'immunosuppression associée à 25 un cancer provoqué par une infection par HPV était concomitante à une augmentation de IL-10 (El Sherif et al. 2001 ; Giannini et al. 1998 ; Giannini et al. 2002) et de TGF-β-1 (Giannini et al. 1998) ainsi qu'à une réduction de l'IFN-gamma sous-épithélial (El Sherif et al. , 2001).

Des travaux antérieurs des inventeurs relatés dans la demande internationale publiée sous le n°WO 00/03732 , ont montré que, dans le cas du cancer du col utérin provoqué par HPV, la protéine E7 du papillomavirus 30 était impliquée dans une immunosuppression locale au niveau des tumeurs ou de cellules infectées.

L'immunosuppression induite par la protéine E7 a été caractérisée par l'inhibition de la prolifération des cellules T stimulées par le PPD ou le toxoïde tétanique, l'inhibition de la prolifération des cellules T stimulées par 35 des cellules allogéniques, la surproduction d'IFN-α (cytokine

immunosuppressive) par les cellules présentant l'antigène (APC). Afin de réduire ou de bloquer l'immunosuppression induite par la protéine E7 soluble de HPV, il a été proposé l'utilisation de dérivés non toxiques de la protéine E7 comme antigène en vue de l'induction d'anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine E7 extracellulaire. En vue de fabriquer des composés immunogènes dérivés de E7 dépourvus des effets délétères de la protéine native, il a été proposé de modifier la protéine E7 native, soit par modification chimique, soit par modification génétique, notamment en opérant des insertions, des délétions ou des substitutions de résidus d'acides aminés destinées à diminuer ou supprimer les sites fonctionnels délétères de la protéine native. Dans ce contexte, il a été décrit une protéine E7 modifiée chimiquement, dénuée d'activité immuno-suppressive, après traitement de la protéine E7 native par le glutaraldéhyde.

Les modifications chimiques proposées pour réduire ou bloquer les propriétés d'immunosuppression de la protéine E7 native, telles que décrites dans l'état de la technique, visent à ajouter un groupe chimique au squelette carboné de la protéine E7 native, par couplage d'une fonction réactive de l'un des acides aminés de cette protéine avec une fonction aldéhyde, carboxamide ou maléimide, sans altération de la séquence en acides aminés de la protéine native, c'est-à-dire sans apporter de modifications significatives à la structure primaire de la protéine E7.

De fait, les diverses compositions immunogènes anti-E7 décrites dans l'état de la technique, en vue de la réalisation de préparations vaccinales préventives ou curatives à l'encontre de cancers provoqués par une infection par HPV-16, qui visent prioritairement l'induction d'une réponse immunitaire par la production de lymphocytes cytotoxiques (CTL) spécifiques de la protéine E7 exprimée à la surface des cellules infectées, contiennent, en tant qu'antigène, soit la protéine E7 complète, éventuellement modifiée chimiquement (Gérard et al., 2001) soit des peptides dérivés de la protéine E7 (Muderspach et al., 2000 ; Schoell, 1999 – précités). Dans tous les cas, y compris lorsque des peptides dérivés de la protéine E7 native sont utilisés, il n'a pas été introduit de modification dans la séquence d'acides aminés de la protéine native, et par conséquent dans la structure primaire d'acides aminés initiale. Cela s'explique simplement par la volonté de conserver intacts les épitopes d'intérêt de la protéine E7.

native afin de favoriser l'induction d'une réponse immunitaire, en particulier la production de cellules CTL, capables de reconnaître spécifiquement et efficacement la protéine E7 native produite par les cellules infectées.

Et même lorsqu'une réorganisation de la structure primaire en acides aminés de la protéine E7 est envisagée, en vue de la production d'une protéine immunogène ayant des propriétés carcinogènes, ou transformantes réduites, il est porté une grande attention à la conservation d'au moins une copie complète de la séquence d'acides aminés de la protéine E7 native au sein du composé immunogène réarrangé, afin de maintenir présent, au sein dudit composé immunogène, l'ensemble des épitopes potentiels de la protéine E7 native.

Ainsi, Osen et al. (2001) ont décrit la construction d'un ADN codant un composé immunogène susceptible d'induire la production de lymphocytes cytotoxiques (CTL) reconnaissant spécifiquement la protéine E7 native exprimée à la surface des cellules cancéreuses infectées par HPV-16, dans une stratégie vaccinale anti-HPV avec de l'ADN, et non directement avec un composé immunogène peptidique. Afin d'éviter tout événement de recombinaison qui pourrait aboutir à une surproduction de protéine E7 native, ou tout au moins d'une protéine recombinée possédant les propriétés carcinogènes de la protéine E7 native, ces auteurs ont construit un ADN codant pour une protéine immunogène dans laquelle l'ensemble des épitopes de la protéine E7 native est représenté, bien que chacun des domaines peptidiques, respectivement (i) domaine 1-10, (ii) domaine 11-40, (iii) domaine 41-70 et (iv) domaine 71-98, aient été intervertis dans le composé peptidique immunogène final. Ces auteurs insistent sur la nécessité de produire un composé peptidique immunogène ayant conservé tous les épitopes CTL potentiels de la protéine E7 native, tout en ayant simultanément perdu ses propriétés de transformation cancéreuses des cellules. En dernier lieu, ces auteurs suggèrent d'accroître encore l'innocuité du composé peptidique immunogène réarrangé, en ce qui concerne son pouvoir cancérigène, en supprimant le domaine de liaison de la protéine E7 native à la protéine pRB du rétinoblastome, allant de l'acide aminé 21 à l'acide aminé 26 de E7, responsable de l'activité carcinogène de la protéine E7 native. Toutefois, ce mode de réalisation

d'un composé peptidique immunogène non carcinogène n'a pas été concrètement réalisé.

DESCRIPTION DE L'INVENTION

5

De manière surprenante, il a désormais été montré selon l'invention qu'il pouvait être obtenu, par mutagenèse dirigée de l'ADN codant la protéine E7 native, une protéine mutée possédant une capacité identique, voire une capacité améliorée, à induire une réponse immunitaire spécifique à l'encontre de la protéine E7 native, et dans laquelle ont été bloquées les propriétés d'immunosuppression de la protéine E7 native.

Il a ainsi été montré pour la première fois selon l'invention, de manière surprenante, que le fragment peptidique allant de l'acide aminé 21 à l'acide aminé 26 de la protéine E7 native était responsable de l'activité immunosuppressive de cette protéine.

Selon l'invention, l'ADN codant le gène E7 a été soumis à un procédé de mutagenèse dirigée de manière à déléter les nucléotides correspondant aux codons codant les acides aminés 21 à 26. L'ADN muté résultant a été cloné dans un vecteur d'expression fonctionnel chez la levure. Après transformation de cellules de levure avec ledit vecteur, le produit d'expression de l'ADN muté, a été purifié à partir du surnageant de culture.

La protéine E7 mutée selon l'invention peut être désignée aussi protéine E7Δ21-26 aux fins de la présente description.

Il est montré selon l'invention que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de HPV-16, lorsqu'il est combiné à un adjuvant de l'immunité approprié, est capable de générer chez la souris une réponse humorale et cellulaire spécifique, permettant ainsi d'induire une immunité anti-tumorale protectrice, comparable sinon supérieure, à celle induite par la protéine E7 native.

Par « produit d'expression » de l'ADN codant la protéine E7 mutée, on entend selon l'invention la ou les protéines résultant de la traduction de l'ADN (ou de l'ARN messager correspondant) codant la protéine E7 mutée définie ci-dessus, dans une cellule hôte.

De plus, il est montré que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de HPV-16 selon l'invention possède une activité thérapeutique anti-tumorale égale ou supérieure à celle de la protéine E7 native.

5 En outre, un caractère essentiel du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de l'invention, consiste, d'une part, en l'absence d'activité immunosuppressive directe de ce dernier et, d'autre part, en l'induction d'un blocage de l'immunosuppression induite par la protéine E7 native secrétée par les cellules cancéreuses.

10 Un premier objet de l'invention consiste en le produit d'expression de l'ADN codant une protéine E7 mutée du papillomavirus HPV-16, dans laquelle les acides aminés 21 à 26 de la protéine E7 native ont été déletés, ladite protéine E7 mutée étant caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence en acides aminés SEQ ID N°1.

15 La séquence en acides aminés de référence de la protéine E7 native est, par exemple, la séquence décrite par Seedorf et al. (1985) dont le numéro d'accès dans la base de données Swissprot est N°P03129.

Acides nucléiques de l'invention

20 L'invention a aussi pour objet un acide nucléique codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1, ainsi qu'un acide nucléique de séquence complémentaire.

25 De préférence, tout acide nucléique et tout polypeptide selon l'invention se présentent sous une forme isolée ou purifiée.

30 Le terme « purifié » ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusive de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative. Un polynucléotide ou un polypeptide est à l'état purifié après une purification du matériel de départ ou du matériel naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence 2 ou 3 et préférentiellement 4 ou 5 ordres de grandeur.

Les termes « acide nucléique », « polynucléotide », « oligonucléotide » ou encore « séquence nucléotidique » englobe des séquences d'ARN, d'ADN, d'ADNc ou encore des séquences hybrides

ARN/ADN d'au moins deux nucléotides, indifféremment sous la forme simple brin ou sous la forme de duplex.

Le terme « nucléotide » désigne à la fois les nucléotides naturels (A, T, G, C) ainsi que des nucléotides modifiés qui comprennent au moins une modification telle que (i) un analogue d'une purine, (ii) un analogue d'une pyrimidine, ou (iii) un sucre analogue, de tels nucléotides modifiés étant décrits par exemple dans la demande PCT N° WO 95/0 4064.

Aux fins de la présente invention, un premier nucléotide est considéré comme étant « complémentaire » d'un second polynucléotide lorsque chaque base du premier nucléotide est appariée à la base complémentaire du second polynucléotide dont l'orientation est inversée. Les bases complémentaires sont A et T (ou A et U), et C et G.

Selon un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1 comprend la séquence nucléotidique SEQ ID N°2.

L'invention englobe également tout acide nucléique codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1 se distinguant de l'acide nucléique de séquence SEQ ID N°2 par une ou plusieurs substitutions d'un nucléotide dans les codons du cadre de lecture ouvert codant la protéine E7 mutée, par exemple en vue d'une adaptation de la séquence nucléotidique en fonction de l'usage préférentiel des codons dans l'organisme hôte dans laquelle l'expression de cette séquence nucléotidique est recherchée, dès lors que la ou les substitutions d'un nucléotide sont « silencieuses », c'est-à-dire qu'elles n'entraînent, lors de leur traduction, aucune modification dans la séquence d'acides aminés SEQ ID N°1.

Un acide nucléique tel que défini ci-dessus est utile principalement lorsqu'il est mis en œuvre pour la production du produit d'expression correspondant.

En conséquence, l'acide nucléique codant la protéine E7 mutée comprend, de préférence, un polynucléotide régulateur contrôlant l'expression de la protéine E7 mutée dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote.

Le polynucléotide régulateur comprend au moins une séquence promoteur capable d'initier la transcription de l'ADN codant la protéine E7

mutée de l'invention dans la cellule hôte choisie. Ce polynucléotide régulateur peut aussi comprendre d'autres séquences nucléotidiques favorisant l'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée, par exemple des séquences activatrices de la transcription bien connues de l'homme du métier.

Préférentiellement, on choisira un promoteur dit « inductible », c'est-à-dire un promoteur sensible à la présence d'un composé inducteur, ledit promoteur dirigeant la transcription de l'ADN placé sous son contrôle uniquement en présence du composé inducteur.

Le promoteur LacZ est un exemple illustratif d'un tel promoteur inductible. Un autre promoteur inductible est le promoteur AOX1, inductible par le méthanol, par exemple le promoteur AOX1 contenu dans le vecteur pPIC9K (Réf. V175-20, Société Invitrogen) utilisé dans les exemples.

Selon l'invention, toute technique classique de biologie moléculaire, de microbiologie et d'ADN recombinant connue de l'homme du métier peut être utilisée afin de préparer un acide nucléique tel que défini ci-dessus. De telles techniques sont décrites par exemple par Sambrook et al. (1989), Glover (1985), Gait (1984) et Ausubel et al. (1989).

Selon un mode de réalisation préféré, ledit acide nucléique comprend un polynucléotide régulateur contrôlant l'expression de la protéine E7 mutée dans la levure, et encore plus spécifiquement dans les cellules de levure de l'espèce *Pichia pastoris*. L'acide nucléique comprenant un ADN codant la protéine E7 mutée selon l'invention, placé sous le contrôle d'un polynucléotide régulateur tel que défini ci-dessus est inclus dans une cassette d'expression.

Cassettes d'expression

Une telle cassette d'expression peut comprendre, outre le polynucléotide régulateur de l'ADN codant la protéine E7 mutée, des séquences non traduites localisées du côté 5' du cadre ouvert de lecture, dites séquences « leader », capables d'augmenter la traduction du produit d'expression, ou des séquences dites « terminateur » bien connues de l'homme du métier.

De manière tout à fait préférée, une cassette d'expression telle que définie ci-dessus comprend en outre une séquence codant pour un peptide signal en vue de la production d'un polypeptide de fusion entre ledit peptide signal et la protéine E7Δ21-26, afin de favoriser la sécrétion du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 et retrouver celui-ci principalement à l'extérieur des cellules, par exemple dans le surnageant de culture cellulaire. De préférence, la séquence nucléotidique codant le peptide signal est localisée immédiatement du côté 5' de la séquence nucléotidique codant la protéine E7Δ21-26.

En général, une cassette d'expression telle que définie ci-dessus comprend en outre un polynucléotide marqueur de sélection, par exemple le gène *his*, afin de sélectionner positivement les cellules hôtes transformées par celle-ci.

15 Vecteurs recombinants

L'invention a également pour objet un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique ou une cassette d'expression tels que définis ci-dessus.

Par « vecteur » au sens de la présente invention, on entend une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme simple brin ou double brin.

Un vecteur recombinant selon l'invention est indifféremment un vecteur de clonage ou un vecteur d'expression.

Il peut s'agir d'un vecteur d'origine bactérienne ou virale.

Les vecteurs bactériens préférés selon l'invention sont par exemple les vecteurs Pbr322 (ATCC37017) ou encore des vecteurs tels que PAA223-3 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et pGEM1 (Promega Biotech, Madison, WI, Etats-Unis).

On peut encore citer d'autres vecteurs commercialisés tels que les vecteurs pQE70, pQE60, pWE9 (Qiagen), psiX174, pBluescript SA, p NH8A, p NH16A, p NH18A, p NH46A, p WLNEO, p SV2CAT, p OG44, pXTI, pSG (Stratagene).

Selon un premier mode de réalisation, un vecteur recombinant selon l'invention est utilisé afin d'amplifier l'acide nucléique ou la cassette

d'expression qui y est insérée, après transformation ou transfection de l'hôte cellulaire désiré.

Selon un second mode de réalisation, il s'agit d'un vecteur d'expression comprenant un acide nucléique ou une cassette d'expression tels que définis ci-dessus, en vue de la transformation d'une cellule hôte choisie pour la production du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 selon l'invention.

Un vecteur recombinant selon l'invention comprend avantageusement aussi des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriée.

Une cassette d'expression telle que définie ci-dessus constitue un mode de réalisation particulier d'un vecteur recombinant selon l'invention.

Une première famille de vecteurs recombinants préférée selon l'invention est constituée des vecteurs d'expression fonctionnels dans les cellules de levure, et de manière tout à fait préférée les vecteurs d'expression fonctionnels dans les cellules de la levure *Pichia pastoris*.

Un exemple illustratif d'un tel vecteur est le vecteur pNIV5114 dont le procédé de fabrication est détaillé dans les exemples, à partir du vecteur pPIC9K (Réf. V175-20-Société Invitrogen).

Une seconde famille de vecteurs recombinants préférés selon l'invention est constituée des vecteurs d'expression fonctionnels dans les cellules de mammifères, y compris l'homme, incluant les vecteurs viraux, y compris les adénovirus recombinants et les virus adéno-associés recombinants, par exemple un adénovirus recombinant humain de type 2 ou de type 5 bien connu de l'homme du métier.

A titre illustratif, il peut s'agir du vecteur recombinant p CDNA.3li-E7Δ21-26 dont le procédé de préparation est détaillé à l'exemple 6.

Pour permettre l'expression de l'acide nucléique codant la protéine E7 mutée, un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus doivent être introduits dans une cellule hôte.

Cellules hôtes recombinantes

5 L'invention est également relative à une cellule hôte transformée par un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus.

Une telle cellule hôte transformée est avantageusement une cellule eucaryote, et de manière préférée une cellule de levure.

10 De manière tout à fait préférée, ladite cellule hôte transformée est une cellule de levure de l'espèce *Pichia pastoris*.

10 Préférentiellement, on utilisera les cellules de la souche SMD 1168 (his4, pep4) de *Pichia pastoris* (Ref. C 175-00, Société Invitrogen).

On utilise avantageusement les cellules de *Pichia pastoris*, respectivement :

- 15 - GS115 (his4) (Réf. C181-00-Invitrogen; ATCC N°20864);
- KM71 (his4; aox1:: ARG4; arg4) (C183-00-Invitrogen, ATCC n°201178).

20 Une autre catégorie de cellules hôtes recombinantes préférées sur les cellules de mammifères, y compris l'homme, transformées par un acide nucléique, une cassette d'expression ou encore un vecteur recombinant selon l'invention.

Selon un mode de réalisation spécifique, il s'agit de cellules autologues prélevées chez un patient, qui sont transformées *in vitro* avec un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant tels que définis ci-dessus, en vue de leur réimplantation chez le patient.

25 L'invention a aussi pour objet une composition comprenant un acide nucléique, une cassette d'expression ou encore un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus.

Procédé d'obtention d'un acide nucléique codant la protéine E7Δ21-26.

L'invention a également trait à un procédé pour la fabrication d'un acide nucléique codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID n°1, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

(a) réaliser une mutagenèse dirigée de l'acide nucléique codant la protéine E7 native par amplification dudit acide nucléique à l'aide respectivement d'une première amorce nucléotidique de séquence SEQ ID n°4, et d'une seconde amorce nucléotidique hybridant avec l'extrémité 3' de l'ADN codant la protéine E7 native .

5 (b) récupérer l'ADN amplifié.

La première amorce nucléotidique, de séquence SEQ ID n°4, comprend le codon codant le résidu thréonine en position 20 de la séquence d'acides aminés de la protéine E7 native (nucléotides 14 à 16) 10 précédant immédiatement le codon codant l'acide aminé glutamine en position 27 de la séquence en acides aminés de la protéine E7 native (nucléotides 17 à 19), ce qui permet l'obtention d'un produit final d'amplification dans lequel les nucléotides inclus dans les codons codant les acides aminés 21 à 26 de la protéine E7 native ont été déletés.

15 La seconde amorce nucléotidique utilisée à l'étape (a) d'amplification peut comprendre, outre une séquence hybridant avec l'extrémité 3' de l'ADN codant la protéine E7 native, également un ou plusieurs sites de reconnaissance par des endonucléases.

20 De préférence, on utilisera, comme seconde amorce nucléotidique, l'amorce de séquence SEQ ID N°5, qui comprend la séquence du site de reconnaissance de l'endonucléase *EcoRI*.

25 L'acide nucléique codant la protéine E7Δ21-26 est inséré dans un vecteur de clonage ou dans un vecteur d'expression, à un site d'insertion prédéterminé, par exemple par ligation dudit acide nucléique avec l'acide nucléique du vecteur, après avoir préalablement ouvert le vecteur hôte, par exemple par coupure nucléotidique à l'aide d'une endonucléase de restriction, de préférence au niveau d'un polysite de clonage.

30 De préférence, on utilisera le vecteur de clonage pPIC9K commercialisé sous la référence V175-20 par la Société Invitrogen.

Avantageusement, l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 est inséré dans ce vecteur au niveau du site de restriction BamHII-Ecori, en aval de la séquence du vecteur codant le peptide signal MFαFactor.

Procédé de production du produit d'expression de l'ADN codant la protéine mutée E7Δ21-26 dans des cellules de levure.

L'invention est également relative à un procédé pour la production du 5 produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée selon l'invention, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- (a) culture de cellules de la levure *Pichia pastoris* transformées par un vecteur recombinant tel que défini ci-dessus ;
- (b) récupération du surnageant de culture à l'issue de l'étape (a) ; et
- 10 (c) purification du produit d'expression à partir du surnageant de culture obtenu à l'étape (b).

De préférence, les cellules de la levure *Pichia pastoris*, transformées par un vecteur recombinant selon l'invention sont des cellules de la souche SMD 1168 (his4, pep4).

15 De manière préférée, le vecteur recombinant utilisé pour transformer les cellules de levure est le vecteur pNIV5114 dont le procédé de préparation est décrit à l'exemple 1, et qui est préalablement clivé, par exemple par l'endonucléase BgIII, avant d'être introduit dans les cellules de levure.

20 Préférentiellement, les cellules de *Pichia pastoris* recombinantes cultivées à l'étape (a) ont été préalablement sélectionnées pour leur capacité à produire de grandes quantités du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26.

25 Selon un aspect préféré, les cellules recombinantes capables de synthétiser à haut niveau le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 sont les cellules possédant un grand nombre de copies du vecteur recombinant. Lorsque le vecteur recombinant comprend le gène marqueur de sélection His, comme c'est le cas du vecteur Pniv5114, les cellules de *Pichia pastoris* contenant le plus grand nombre de copies du vecteur recombinant peuvent être sélectionnées sur leur capacité à se multiplier en présence de fortes concentrations du composé G418, par exemple des concentrations du composé G418 allant jusqu'à 4mg/ml.

30 De manière avantageuse, l'étape (a) de culture des cellules de *Pichia pastoris* transformées, et préalablement sélectionnées pour leur haute capacité de synthèse du produit d'expression de l'ADN codant la

protéine E7Δ21-26, sont inoculées dans un réacteur de fermentation approprié contenant un milieu de culture adapté.

Durant une première phase (i) de culture, les cellules inoculées dans le milieu de culture sont cultivées en vue de leur multiplication. Durant cette 5 phase (i) de culture, le pH du milieu est avantageusement maintenu à une valeur inférieure à 5, afin de bloquer, ou tout au moins de réduire, le relargage ou la sécrétion de protéines « contaminantes » autres que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26, dans le milieu de culture. La température de culture est avantageusement maintenue aux 10 alentours de 30°C, de préférence entre 27°C et 33°C, et de manière tout à fait préférée entre 29°C et 31°C.

Avantageusement, cette phase (i) de préculture est réalisée sous agitation constante de la culture cellulaire, par exemple à une vitesse allant de 100 à 1000 tours/minute.

15 Avantageusement, l'oxygène dissous est maintenu à une concentration pondérale d'environ 20%, par exemple au moyen d'une agitation comprise entre 300 et 1000 tours/minute.

Cette phase (i) de préculture est poursuivie jusqu'à l'apparition d'un premier pic de consommation de l'oxygène dissous, qui est classiquement 20 observé après environ 18 heures de culture.

La phase (i) de préculture est suivie d'une phase (ii) de culture pendant laquelle les cellules de *Pichia pastoris* transformées sont placées dans des conditions de milieu de culture induisant la production d'une grande quantité du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21- 25 26.

Afin d'induire la synthèse dudit produit d'expression, on ajoute au milieu de culture le composé inducteur auquel le promoteur inductible est sensible.

Dans le cas des cellules de *Pichia pastoris* décrites à l'exemple 1, 30 qui sont transformées par une cassette d'expression comprenant le promoteur inductible AOX1, on ajoute du glycérol, le composé inducteur correspondant, au milieu de culture.

De manière tout à fait préférée, on ajuste le pH du milieu de culture à une valeur au moins égale à 5, préférentiellement à une valeur comprise 35 entre 5 et 6. L'ajustement du pH au moment de l'induction de la synthèse

du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 permet d'assurer une stabilité optimale du produit d'expression ainsi synthétisé, qui possède un pI d'environ 4,5.

En général, la température au moment de l'étape (ii) de culture est 5 maintenue aux alentours de 30°C.

Il est également possible d'abaisser la valeur de température au moment de l'étape (ii) de culture aux alentours de 25°C, de préférence entre 23 et 27°C et mieux entre 24°C et 26°C, afin de réduire significativement la production concomitante de protéines 10 « contaminantes » autres que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26.

La quantité du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 peut être encore accrue par l'addition de méthanol au milieu de culture au moment de l'apparition d'un second pic de consommation de 15 l'oxygène dissous, puis maintient de la concentration de méthanol durant la totalité de l'étape (ii) de culture .

En général, le second pic de consommation de l'oxygène dissous est observé environ 3 heures après l'induction de la synthèse du produit 20 d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 par l'addition de glycérol.

Avantageusement, le méthanol est maintenu à une concentration comprise entre 3 et 7g/l, de préférence entre 4 et 6 g/l et de manière préférée à environ 5g/l .

Avantageusement, la durée de l'étape (ii) de culture est comprise 25 entre 20 et 40 heures, de préférence entre 25 et 35 heures et est en général d'environ 30 heures.

A l'étape (b) du procédé de production du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26, on récupère le surnageant de culture selon toute technique connue, par exemple par centrifugation de la biomasse, puis filtration du surnageant de culture.

A l'étape (c) du procédé ci-dessus, le produit d'expression est ensuite purifié selon toute technique connue de l'homme du métier, par exemple par purification chromatographique.

De préférence, on utilisera une purification par chromatographe telle 35 qu'une colonne de Q Sepharose XL comme décrit à l'exemple 1.

L'invention est également relative à une composition comprenant la protéine E7 mutée, telle qu'obtenue à l'issue du procédé de production défini ci-dessus.

5 Compositions comprenant la protéine E7 mutée de l'invention.

L'invention a aussi pour objet toute composition comprenant la protéine E7 mutée, comprenant la séquence en acides aminés de séquence SEQ ID n°1.

10 L'invention a également pour objet toute composition comprenant le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 de séquence SEQ ID N°2.

15 Il a été observé selon l'invention que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 pouvait, dans certains cas, être constitué de plus d'une espèce protéique.

De manière reproductible, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 possède un point isoélectrique (pl) compris entre 5 et 5,4.

* Une analyse de la séquence N-terminale du produit d'expression possédant le pl de 5 à 5,4 a permis de montrer qu'il était constitué de plus d'une espèce protéique. Il est ainsi obtenu de manière reproductible un produit d'expression comportant principalement les protéines dont la séquence N-terminale est respectivement la suivante :

20 - NH₂-MLDLQPETT (protéine commençant à l'acide aminé en position 12 de la séquence SEQ ID N°1); et

25 - NH₂-DLQPETT (protéine commençant à l'acide aminé en position 14 de la séquence SEQ ID N°1) ; et

30 - NH₂QLNDSSEEEEDI (protéine commençant à l'acide aminé en position 27 de la séquence SEQ ID N °1).

35 Selon les lots de production, il peut arriver que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 comprenne aussi, en très faibles quantités, deux autres protéines dont la séquence N-terminale est respectivement la suivante :

35 - NH₂-LDLQPETT (protéine commençant à l'acide aminé en position 14 de la séquence SEQ ID N°1) ;

et

-NH₂-EYMLDLQP (protéine commençant à l'acide aminé en position 10 de la séquence SEQ ID N°1).

La protéine dont la séquence N-terminale est « EYMLDLQP » est retrouvée dans le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 en quantités beaucoup plus faibles que les deux autres protéines.

Dans certains lots, il a aussi été observé la présence d'une protéine dont la séquence N-terminale est NH₂-IVTFCCCKCDS (protéine commençant à l'acide aminé en position 54 de la séquence SEQ ID N°1). Toutefois, la présence ou l'absence de cette protéine dans le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26 ne modifie pas les propriétés immunogènes et non-immunosuppressives du produit d'expression .

Comme cela a déjà été précisé succinctement précédemment, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID n°1 induit une réponse immunitaire à l'encontre de la protéine E7 native au moins du même ordre que la réponse immunitaire induite par la protéine E7 native elle-même. Et la protéine E7 mutée selon l'invention est dépourvue, sur les cellules immunitaires humaines, des propriétés immuno-suppressives qui caractérisent notamment la protéine E7 native.

L'invention a donc encore pour objet une composition pharmaceutique préventive ou curative d'une infection par HPV-16, et plus spécifiquement d'un cancer induit par une infection par HPV-16, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée telle que définie ci-dessus, le cas échéant en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.

De préférence, ladite composition pharmaceutique se présente sous une forme adaptée à l'administration d'une quantité hebdomadaire allant de 10 à 1000 µg de la protéine E7 mutée, ou du produit d'expression de l'ADN codant celle-ci.

Il est montré selon l'invention que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1, lorsqu'il est administré en combinaison avec un adjuvant de l'immunité approprié, est capable de générer une réponse immunitaire humorale et cellulaire dirigée

contre la protéine E7 native permettant ainsi d'induire une immunité préventive à l'encontre des tumeurs. De plus, l'immunité protectrice induisant un état de résistance anti-tumorale provoquée par l'administration du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée est égale ou 5 supérieure à celle qui est obtenue après immunisation préalable avec la protéine E7 native.

Il a aussi été montré que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1 est capable d'induire une immunité anti-tumorale thérapeutique, lorsque cette protéine est 10 administrée, en association avec un adjuvant de l'immunité appropriée, à un individu ayant déjà développé des tumeurs. La réponse immunitaire anti-tumorale thérapeutique induite par le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée est significativement supérieure à celle qui peut être obtenue après administration de la protéine E7 native.

15 De tels résultats sont illustrés à l'exemple 3 où il est montré, dans un modèle murin, que l'immunité thérapeutique anti-tumorale induite par le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée permet d'allonger la durée de vie moyenne des animaux de 1,5 fois, par rapport à la durée de vie moyenne des animaux chez lesquels on a administré la 20 protéine E7 native.

Il a également été montré que l'immunité antitumorale préventive de l'immunité antitumorale thérapeutique induite par le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée était due à l'induction simultanée d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire spécifique

25 Ainsi, les résultats des exemples montrent que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée est capable d'induire une immunité humorale systémique à l'encontre de la protéine E7 native . Il a en particulier été montré qu'un haut niveau d'anticorps anti-E7 d'isotype IgG était produit, principalement des anticorps d'isotypes IgG2b et IgG1.

30 De plus, l'administration du produit d'expression de l'ADN codant de la protéine E7 mutée à un individu, dans les conditions appropriées, permet aussi d'induire une immunité de type mucosal, comme en témoignent le haut niveau de réponse anticorps d'isotype IgA présenté à l'exemple 3.

35 De plus, selon une caractéristique essentielle de la protéine E7 mutée, cette protéine qui est elle-même dépourvue de l'activité

immunosuppressive directe de la protéine E7 native, permet aussi de bloquer l'activité immunosuppressive de la protéine E7 soluble sécrétée par les cellules cancéreuses, du fait du caractère neutralisant des anticorps produits après immunisation avec la protéine E7 mutée, comme en témoignent les résultats de l'exemple 2.

Les résultats des exemples montrent également que le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée permet la prolifération de cellules TCD4+ et TCD8+ reconnaissant spécifiquement la protéine E7, cette prolifération cellulaire étant accompagnée par une surproduction de la cytokine IFN- γ .

L'invention est également relative à une composition immunogène comprenant, à titre de principe actif, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description, le cas échéant en association avec un ou plusieurs excipients ou adjuvants de l'immunité physiologiquement compatible.

Une telle composition immunogène peut être utilisée de manière préventive, dans l'objectif d'induire une immunité anti-tumorale protectrice vis-à-vis d'une infection par HPV-16.

Une telle composition immunogène peut également être utilisée à titre thérapeutique ou curatif d'une infection par HPV-16, en particulier d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16.

L'invention concerne également l'utilisation du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, ou pour la fabrication d'une composition immunogène telle que décrite ci-dessus.

La présente invention a également pour objet un procédé pour la fabrication d'une composition pharmaceutique, ou d'une composition immunogène, destinée à induire une immunité protectrice préventive ou une immunité thérapeutique à l'encontre d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16, tout en bloquant l'état d'immunosuppression induit par la protéine E7 native, caractérisé en ce qu'il comporte une étape au cours de laquelle le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée est combiné avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.

L'invention est également relative à une composition vaccinale préventive ou curative d'un cancer provoqué par une infection à papillomavirus, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité immunologiquement efficace du produit d'expression de l'ADN codant 5 protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description, en association avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.

Afin de lutter contre l'immunosuppression locale au niveau des cellules cancéreuses infectées par HPV-16 , induites par la protéine E7 extracellulaire puis de stimuler une réponse immunitaire efficace à l'encontre de ces cellules cancéreuses , qui présentent à leur surface membranaire la protéine E7 native, ou des peptides dérivés de la protéine E7 native après maturation intracellulaire, en association avec un antigène de classe I du MHC, il est important d'induire la production d'anticorps, 10 notamment d'anticorps de l'isotype IgG, capables de neutraliser l'effet immunosuppressif de la protéine E7 soluble sécrétée par les cellules cancéreuses infectées par le virus HPV-16. De plus, il est essentiel 15 d'induire simultanément la production de lymphocytes cytotoxiques (CTL) capables de reconnaître spécifiquement la protéine E7 native, ou un peptide qui en est dérivé, exposé à la surface membranaire des cellules cancéreuses, afin de détruire ces cellules. Pour atteindre ces objectifs, il est 20 nécessaire d'induire une réponse immunitaire de type systémique.

De plus, les papillomavirus humains étant détectés principalement dans les cancers des muqueuses, en particulier les cancers ano-génitaux, y compris le cancer du col utérin chez la femme, il est important de compléter 25 les effets préventifs ou thérapeutiques de l'induction d'une réponse immunitaire de type systémique par l'induction d'une réponse immunitaire de type mucosal, notamment en stimulant la production d'anticorps d'isotype IgA au niveau local, sur les muqueuses.

30 Selon les objectifs poursuivis, on utilise des adjuvants de l'immunité capable d'orienter la réponse vers une immunité systémique ou mucosale.

Parmi les adjuvants de l'immunité systémique, on utilise de 35 préférence les adjuvants de type IFA (adjuvant incomplet de Freund), le phosphate de calcium ou l'hydroxyde d'alumine. On peut aussi utiliser l'adjuvant QuilA, commercialisé par Brenntay Biosector, Danemark.

Parmi les adjuvants de l'immunité mucosale, on utilise de préférence des adjuvants comme la choleratoxine B (CTB) ou encore un mutant de la toxine LT (LT μ), bien connus de l'homme du métier.

5 L'induction d'une réponse immunitaire de type systémique et/ou ou de type mucosal est aussi influencée par la voie d'administration de la composition vaccinale de l'invention.

Ainsi, l'administration de la composition vaccinale par voie parentérale, sous-cutanée ou intradermique favorisera l'induction d'une 10 réponse immunitaire systémique, accompagnée le cas échéant également d'une réponse immunitaire mucosale.

L'administration de la composition vaccinale selon l'invention au niveau local, par exemple par instillation nasale ou encore par application locale à la surface des muqueuses, favorisera l'induction d'une réponse immunitaire de type mucosal.

15 La présente invention a également pour objet une méthode de traitement préventif ou curatif d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16 caractérisée en ce qu'elle comporte une étape au cours de laquelle on administre aux patients une quantité immunologiquement efficace d'une composition vaccinale telle que définie dans la présente description.

20 De préférence, on administre à un patient, sous une forme adaptée à l'administration systémique et/ou mucosale, une composition vaccinale de l'invention en quantité suffisante pour être efficace sur le plan préventif ou thérapeutique, à un sujet ayant besoin d'un tel traitement. La dose administrée de la protéine E7 mutée, ou du produit d'expression de l'ADN 25 codant la protéine E7 mutée, peut aller par exemple de 10 à 1000 μ g par voie parentérale, une fois par semaine pendant deux mois, puis périodiquement en fonction du niveau de la réponse cellulaire ou humorale induite, par exemple tous les deux à six mois.

Selon un premier aspect, la composition vaccinale selon l'invention 30 est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps neutralisant l'activité immunosuppressive de la protéine E7 sauvage.

Selon un premier mode de réalisation particulier, ladite composition 35 vaccinale est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant

susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps neutralisants d'isotype IgA.

Selon un second mode de réalisation préféré, ladite composition vaccinale est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgG.

Selon encore un autre mode de réalisation préféré, une composition vaccinale selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend la combinaison (i) d'un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgA et (ii) d'un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgG.

De préférence, la composition vaccinale selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant de l'immunité susceptible d'induire une réponse immunitaire à la fois humorale et cellulaire.

De préférence, on cherchera à obtenir l'induction d'une réponse cellulaire, caractérisée notamment par la prolifération de lymphocytes T exprimant l'antigène CD8 et reconnaissant spécifiquement la protéine E7 sauvage, telle que présentée à la surface des cellules cancéreuses en association avec les antigènes de classe I du MHC.

Selon un autre mode de réalisation particulier d'une composition vaccinale selon l'invention, cette composition vaccinale peut comprendre un ou plusieurs autres composés antigéniques ou immunogènes de HPV. Par exemple, dans une composition vaccinale selon l'invention, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée peut être associé à une ou plusieurs protéines de capside de HPV-16, ou à des peptides obtenus à partir de ces protéines de capside, en particulier les protéines L1 et L2 de HPV-16 bien connues de l'homme du métier.

Selon encore un autre mode de réalisation particulier, la composition vaccinale selon l'invention peut comprendre un ou plusieurs composés antigéniques ou immunogènes capables d'induire une réponse immunitaire cellulaire ou humorale à l'encontre de types de HPV distincts de HPV-16, préférentiellement de type de HPV connus pour provoquer des cancers, tels que HPV-18, 31, 33 et 51.

Dans encore un autre mode de réalisation particulier d'une préparation vaccinale selon l'invention, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée peut être combiné avec un ou plusieurs composés antigéniques ou immunogènes capables d'induire la production d'anticorps à l'encontre de facteurs solubles à propriétés immunsuppressives ou angiogéniques tels que l'IFN α , le TGF β , le TNF α ou encore le VEGF. De préférence, ces composés antigéniques ou immunogènes sont respectivement l'IFN α , le TGF β , le TNF α ou le VEGF modifiés chimiquement de manière à détruire leurs propriétés immunsuppressives et/ou à les stabiliser . De telles modifications chimiques, par exemple par carboxyméthylation, sont bien connues de l'homme du métier. Elles sont notamment décrites par Frankel et al. (1988).

Selon un aspect préféré de ce mode de réalisation particulier d'une composition vaccinale selon l'invention, le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée et au moins un autre composé antigénique ou immunogène sont liés chimiquement pour former un composé super immunogène tel que décrit dans la demande de brevet français n°01 10.751 déposée le 10 Août 2001 au nom de la Société NEOVACS.

20 ***Superimmunogènes composites***

Un tel superimmunogène composite comprend deux polypeptides immunogènes distincts physiquement liés l'un à l'autre, les deux polypeptides consistant respectivement en :

- 25 (a) un premier polypeptide immunogène induisant une réaction immunitaire cellulaire, ou une réaction immunitaire cellulaire et humorale, à l'encontre d'une structure antigénique pathogène cellulaire de HPV16 ;
- (b) un second polypeptide immunogène induisant la production d'anticorps neutralisants ou bloquants à l'encontre d'une protéine circulante locale du stroma choisie parmi un facteur cytokinique ou un facteur de régulation cellulaire à propriétés immunotoxiques ou angiogéniques, ce facteur étant produit par les cellules cancéreuses ou les cellules stromales, y compris les lymphocytes T et les cellules présentant l'antigène (APC).

Le superimmunogène composite utilisé selon l'invention est dit « bifonctionnel » car les deux polypeptides (a) et (b), qui sont les deux parties essentielles qui le constituent, permettent l'induction simultanée d'une réaction immunitaire dirigée contre deux cibles distinctes, 5 respectivement la structure antigénique pathogène et la protéine circulante locale du stroma. Toutefois, un superimmunogène composite bifonctionnel selon l'invention peut comprendre dans sa structure une pluralité de copies respectivement d'un polypeptide (a) et/ou d'un polypeptide (b).

Le polypeptide (a) et le polypeptide (b) constitutifs d'un composé 10 superimmunogène composite de l'invention sont dits « physiquement liés » l'un à l'autre car ils sont dans tous les cas inclus tous les deux dans une même structure physique, molécule ou particule (microparticule ou nanoparticule), au sein de laquelle ils sont peu distants l'un de l'autre. Du fait qu'ils sont physiquement liés l'un à l'autre dans le superimmunogène 15 composite, le polypeptide (a) et le polypeptide (b) sont présentés conjointement aux mêmes cellules immunocompétentes, aussi bien les macrophages que les lymphocytes T ou B.

Selon un premier mode de réalisation préféré d'un superimmunogène composite, les polypeptides (a) et (b) sont choisis 20 respectivement parmi :

- **Polypeptide (a)** : les protéines L1 et L2 du papillomavirus HPV-16, détoxiquée ou stabilisée si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces protéines ou encore une protéine immunogène qui en est dérivée (Le Buanec et al., 1999) ;
- 25 - **Polypeptide (b)** : la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1, ou une protéine choisie parmi les espèces protéiques contenues dans le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26.

Selon un second mode de réalisation préféré d'un superimmunogène composite, les polypeptides (a) et (b) sont choisis respectivement parmi ::

- 30 - **Polypeptide (a)** : la protéine E7 mutée de séquence SEQ ID N°1, ou une protéine choisie parmi les espèces protéiques contenues dans le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26.
- **Polypeptide (b)** : les protéines IFN α , TGF β , TNF α et VEGF, détoxiquées ou stabilisées si cela est nécessaire, des fragments immunogènes de ces 35 protéines ou une protéine immunogène qui en est dérivée.

Selon un mode de réalisation avantageux, l'invention concerne aussi une composition comprenant plusieurs superimmunogènes composites se distinguant par l'identité de la protéine (polypeptide (a) ou polypeptide (b), selon le type de superimmunogène composite) provenant du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26.

Préférentiellement une composition comprenant plusieurs superimmunogènes composites comprendra des superimmunogènes dont le polypeptide (a) ou le polypeptide (b) seront selon le cas, constitués de chacune des protéines contenues dans le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7Δ21-26, dans des proportions relatives, par exemple pondérales, similaires ou identiques aux proportions relatives de chacune des espèces protéolitiques présentes initialement dans ledit produit d'expression.

Pour fabriquer un superimmunogène composite selon l'invention, on réalise un couplage du polypeptide (a) et du polypeptide (b) par voie chimique ou par recombinaison génétique.

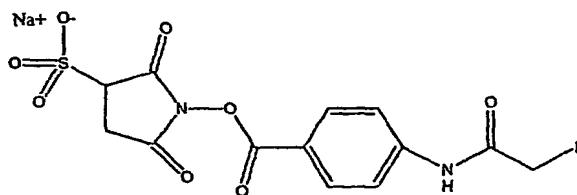
Dans un mode de réalisation particulier du conjugué peptidique immunogène de l'invention, les polypeptides (a) et (b) sont liés directement entre eux de manière covalente, par exemple via une liaison peptidique-CO-NH-.

Cependant, afin d'introduire une certaine flexibilité dans la structure du conjugué peptidique immunogène, et notamment de permettre une mobilité dans l'espace des polypeptides (a) et (b), l'un par rapport à l'autre au sein du conjugué peptidique immunogène, on préfère un conjugué peptidique dans lequel les polypeptides (a) et (b) sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué, par une chaîne espaceur.

Selon un premier mode de réalisation préféré d'un conjugué peptidique immunogène, les polypeptides (a) et (b) sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué, par une chaîne espaceur choisie parmi le SMCC ou le SIAB, qui sont tous les deux des composés bifonctionnels.

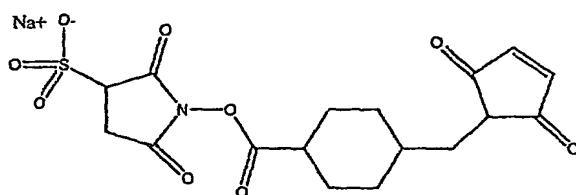
Le composé SIAB, décrit par Hermanson G.T. (1996, Bioconjugate techniques, San Diego : Academic Press, pp 239-242), est le composé de formule (I) suivante :

(I)



5 Le composé SIAB comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe iodoacétate et un groupe ester Sulfo-NHS, ces groupes réagissant respectivement sur des groupes amino et sulfhydryl.

Le composé SMCC, qui est décrit par Samoszuk M.K. et al. (1989, Antibody, Immunoconjugates Radiopharm., 2(1) : 37-46), est le composé de
10 formule (II) suivante :



(II)

15 Le composé SMCC comprend deux groupes réactifs, respectivement un groupe ester Sulfo-NHS et un groupe maléimide, qui réagissent respectivement avec un groupe amino et un groupe sulfhydryl.

Selon un second mode de réalisation préféré, le superimmunogène
20 composite comprend une chaîne espaceur constituée d'un peptide espaceur linéaire . On choisira de préférence un peptide espaceur linéaire ayant de 3 à 30 acides aminés de longueur, avantageusement de 5 à 20 acides aminés de longueur et de manière tout à fait préférée de 7 à 15 acides aminés de longueur.

25 Préférentiellement, le peptide espaceur linéaire est essentiellement, voire exclusivement, constitué d'acides aminés chargés positivement ou

négativement à pH 7,0 afin d'accroître l'hydrophilicité globale dudit superimmunogène composite. On comprend que l'on devra éviter d'utiliser des peptides espaces constitués d'acides aminés hydrophobes. De manière préférentielle, le peptide espaceur est caractérisé en ce qu'il est constitué d'une chaîne de poly-(lysine) constituée de 3 à 30 résidus lysine, avantageusement de 5 à 20 et de manière tout à fait préférée de 7 à 15 résidus lysine de longueur.

Selon encore un autre mode de réalisation d'un superimmunogène composite selon l'invention, les polypeptides (a) et (b) sont séparés l'un de l'autre, au sein dudit conjugué peptidique, par une chaîne espaceur constituée d'un peptide espaceur ramifié, de préférence une structure oligodendrimérique de poly(lysine), telle que décrite par exemple par Basak et al. (1995).

Dans ce dernier mode de réalisation d'un superimmunogène composite selon l'invention, ledit conjugué peptidique peut comprendre plusieurs copies des polypeptides (a) et (b) par molécule de conjugué, avantageusement de 2 à 8 copies des polypeptides (a) et (b), de préférence au plus 4 copies de chacun des polypeptides (a) et (b) par molécule de conjugué.

Les polypeptides (a) et (b) peuvent aussi être inclus tous les deux au sein d'une même structure physique par exemple sur des nanoparticules ayant un diamètre compris entre 10 et 500 nanomètres de préférence 10 et 1000 nanomètres, et de manière tout à fait préférée entre 10 et 100 nanomètres, par exemple des nanoparticules d'IMS, comme décrit par exemple par Aucouturier et al. (2001), de chitosan, comme décrit par exemple par Skaugrud et al. (1999), de liposomes, ou de particules biodégradables comme le polylactide acide (PLA), le poly- ϵ -caprolactone (PLC) ou le poly(lactide-coglycolide) (PLG) décrit par Baras et al. (1999).

Selon encore un autre mode de réalisation, les polypeptides (a) et (b) sont liés physiquement au sein d'une même structure porteuse permettant leur présentation simultanée aux cellules du système immunitaire. Dans ce mode de réalisation particulier, les polypeptides (a) et (b) sont immobilisés sur des nanoparticules, par exemple des nanoparticules de chitosan, de IMS (Immunomodulateur accessible auprès de la Société Seppic, France),

constitué de nanoparticules lipidiques d'un diamètre de 100 à 300 nanomètres) ou de liposomes.

Préférentiellement, de telles nanoparticules sont de faible taille de manière à présenter simultanément les polypeptides (a) et (b) aux cellules, 5 de la même manière que si ces polypeptides étaient liés de manière covalente au sein de la même molécule. Avantageusement les nanoparticules ont un diamètre compris entre 10 et 1000 nm, mieux entre 10 et 500 nm, préférentiellement entre 10 et 300 nm et de manière tout à fait préférée entre 10 et 200 nm.

10

Compositions vaccinales contenant un acide nucléique codant la protéine E7 mutée selon l'invention.

L'invention a aussi pour objet une composition immunogène, ou une 15 composition vaccinale, préventive ou curative d'un cancer provoqué par une infection à papillomavirus, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité immunologiquement efficace d'un acide nucléique codant la protéine E7 mutée, d'une cassette d'expression ou encore d'un vecteur recombinant tel que défini dans la présente description.

20 Pour la mise en œuvre de la composition vaccinale ci-dessus, on préfère, en tant que vecteur d'expression, un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par Flotte et al. (1992), Samulski et al. (1989), ou encore McLaughlin et al. (1996). Pour introduire les acides nucléiques, les 25 cassettes d'expression ou les vecteurs dans une cellule hôte, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à différentes techniques, comme la technique de précipitation au phosphate de calcium (Graham et al.), 1973, Chen et al. 1987), le DEAE dextran (Gopal, 1985), l'électroporation (Tur-kaspa, 1986, Potter et al. 1984), la micro-injection directe (Harland et 30 al. , 1985) ou encore les liposomes chargés en ADN (Nicolau et al., 1987 ; Fraley et al., 1980).

Selon un mode de réalisation particulier, une méthode pour introduire 35 un acide nucléique ou une cassette d'expression selon l'invention dans une cellule hôte, en particulier une cellule hôte provenant d'un mammifère, *in vivo*, comprend une étape au cours de laquelle on introduit une préparation

comportant l'acide nucléique ou la cassette d'expression dans un véhicule pharmaceutiquement compatible, par injection locale au niveau du tissu choisi, par exemple un tissu musculaire lisse ou encore un tissu muqueux, l'acide nucléique ou la cassette d'expression étant absorbé par les cellules de ce tissu.

Des compositions pour l'utilisation *in vitro* et *in vivo* comprenant des acides nucléiques ou des cassettes d'expression « nus » sont par exemple décrites dans la demande PCT N°WO 95/11.307 ainsi que dans les articles de Tacson et al. (1996) et de Huygen et al. (1996).

Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

La quantité de vecteur qui est injectée à l'organisme hôte choisi varie selon le site de l'injection. A titre indicatif, il peut être injecté entre environ 10 µg et 1000 µg de l'acide nucléique ou de la cassette d'expression codant la protéine E7 mutée selon l'invention dans le corps d'un patient.

Compositions destinées à la vaccination passive antitumorale.

Comme cela apparaît clairement dans la présente description, la production d'anticorps systémiques ou mucosals est essentielle afin de bloquer les propriétés immunosuppressives de la protéine E7 sécrétée par les cellules cancéreuses infectées par HPV-16.

Dans la situation dans laquelle une composition vaccinale comprenant la protéine E7 mutée ou la composition vaccinale comprenant un acide nucléique, une cassette d'expression ou un vecteur recombinant codant la protéine E7 mutée, est utilisée à titre thérapeutique, c'est-à-dire après l'événement d'infection par HPV-16, il est avantageux de bloquer rapidement l'effet immunosuppressif de la protéine E7 produite et sécrétée par les cellules cancéreuses afin de favoriser l'induction rapide d'une réponse immunitaire humorale et cellulaire par ladite composition vaccinale, dans le but d'augmenter encore l'efficacité de celle-ci.

Le blocage précoce de l'effet immunosuppressif de la protéine E7 produite par les cellules infectées peut être réalisé en administrant aux patients une quantité efficace d'anticorps neutralisants obtenus après immunisation de l'homme ou de l'animal à l'encontre de la protéine E7

native, en utilisant la protéine E7 mutée de l'invention en tant que composé antigénique ou immunogène, en association avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité appropriée.

L'invention concerne aussi un procédé de préparation d'anticorps neutralisant l'effet immunsuppressif de la protéine E7 native de HPV-16, caractérisé en ce qu'il comporte une étape dans laquelle on immunise un mammifère, y compris l'homme, à l'aide du produit d'expression de l'ADN codant de la protéine E7 mutée de l'invention, puis on récupère les anticorps produits.

10 L'invention est aussi relative à des anticorps dirigés contre le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée selon l'invention. Ces anticorps sont notamment caractérisés en ce qu'ils sont neutralisants, c'est-à-dire qu'ils neutralisent l'effet immunsuppressif de la protéine E7 native.

15 L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique contenant des anticorps neutralisant l'effet immunsuppressif de la protéine E7 native de HPV 16, en particulier la protéine E7 sécrétée par des cellules infectées par HPV-16, lesdits anticorps étant dirigés contre la protéine E7 mutée selon l'invention.

20 Elle est aussi relative à une composition pour vaccination passive à l'encontre d'une infection par HPV-16, y compris à l'encontre d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16, contenant les anticorps définis ci-dessus.

25 Pour vérifier la capacité neutralisante des anticorps selon l'invention, l'homme du métier se réfère avantageusement au test décrit à l'exemple 2 , consistant à quantifier le pourcentage d'inhibition de la production d'IFN- α ou de TNF- α par des macrophages humains exposés à la protéine E7 native.

30 L'invention a encore pour objet une méthode pour bloquer l'effet immunsuppressif de la protéine E7 produite par des cellules infectées par le virus HPV-16, caractérisée en ce que l'on administre aux patients une quantité neutralisante d'anticorps obtenus après immunisation de l'homme ou de l'animale avec la protéine E7 mutée telle que définie dans la présente description.

Les anticorps peuvent être des anticorps d'isotype IgA ou d'isotype IgG. Ils peuvent être des anticorps polyclonaux ou encore des anticorps monoclonaux.

Les anticorps selon l'invention englobent également les fragments F(ab')₂ ou F(ab).

L'invention est en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

Figure 1, un cliché SDS-PAGE de E7Δ21-26.

Figure 2, un cliché Western-Blot de E7Δ21-26 ;

Figure 3, un cliché d'une isoélectrofocalisation sur agarose de E7Δ21-26 ;

Figure 4, un graphe des titres d'anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figure 5, un graphe du pourcentage de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figure 6, un graphe de l'index de prolifération Ip de splénocytes de souris naïves et de souris immunisées avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figure 7, un graphe du taux d'IFN-γ de splénocytes de souris naïves et de souris immunisées avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figures 8 à 12, des graphes du titre d'IgG anti-E7 sérique de souris et des pourcentages de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figure 13, un graphe représentant la classe de IgG sériques obtenue après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figure 14, un graphe du taux d'IFN-γ produit par les splénocytes de souris naïves et immunisées avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figures 15 et 16, des graphes du titre d'IgG anti-E7 sérique de souris et des pourcentages de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sériques de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figure 17, un graphe représentant le taux d'IgA présent dans les sécrétions vaginales de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figures 18 et 19, des graphes du titre d'IgG anti-E7 sérique de souris et des pourcentages de neutralisation des anticorps IgG anti-E7 sérique de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figure 20, un graphe représentant le taux d'IgA présent dans les sécrétions vaginales de souris, avant et après immunisation avec une préparation E7Δ21-26 ;

Figures 21, 22 et 23 des graphes de la croissance tumorale de cellules C3 injectées à des souris immunisées ou non avec une préparation E7Δ21-26 .

EXEMPLES

Exemple 1 : Préparation de la protéine E7 mutée de HPV-16 selon l'invention

1.1. Préparation et clonage de l'acide nucléique codant la protéine E7 mutée.

Pour le clonage du gène de la protéine E7 sauvage dans le vecteur pPIC9K (Invitrogen), propice à l'expression de protéines en *Pichia pastoris*, nous sommes partis d'un plasmide pNIV5101. Ce plasmide est le vecteur pMALcRI contenant le gène de E7 de HPV-16 (plasmide fourni par le laboratoire d'Arsène Burny).

La cassette E7 est isolée de pNIV5101 après une double digestion Ncol-SalI. Les extrémités sont rendues blunt et le fragment est inséré dans le plasmide pPIC9K ouvert par SnaBI. Dans cette construction, la E7 exprimée possède une Tyrosine supplémentaire en position amino-terminale.

Ce résidu supplémentaire a été déléte par mutagenèse dirigée (Kit : Transformer Site-directed mutagenesis, Clontech) et à l'aide d'un oligonucléotide synthétique :

5'GAGAAAAGAGAGGGCTGAAGCTCATGGAGATACACCTAC3'

(SEQ ID N°3). La séquence en gras correspond à la fin du gène de la séquence signal de MFα-factor.

Le plasmide résiduel pNIV5102 code pour l'expression de E7 HPV-16 sauvage en *P. pastoris*. La cassette « signal MFα-factor-E7 », isolée de

pNIV5102 après une digestion *BamHI-EcoRI* blunt, est introduite dans le vecteur pBluescript (Stratagene)ouvert par *BamHI-EcoRI* blunt pour la délétion des AA 21-26. Ce plasmide est nommé pNIV5103. La délétion Δ 21-26 et l'introduction d'un site *EcoRI* après le codon STOP est réalisée

5 par mutagenèse dirigée et à l'aide de deux oligonucléotides :

a) 5'GCAACCAGAGACAACTCAATTAAATGACAGCTCAG3' (SEQ ID N°4). Le codon en gras correspond à celui de l'AA 20 alors que le codon souligné code pour l'AA 27 ;

b) 5'GTTCTCAGAAACCATAATGAATTCATGTTTCAGGACCCACAG3'

10 (SEQ ID N° 5). La séquence en gras correspond au site *EcoRI*.

Cette construction, appelée pNIV5109, contient donc la cassette signal MF α -factor -E7 Δ 21-26. La construction finale consiste en l'ouverture de pPIC9K par *BamHI-EcoRI* et l'introduction de la cassette signal MF α -factor -E7 Δ 21-26 isolée de pNIV5109 après une digestion *BamHI-EcoRI*. Le

15 plasmide d'expression final porte le numéro pNIV5114.

1.2. Transformation des cellules de levure *Pichia pastoris* avec le vecteur d'expression recombinant codant la protéine E7 mutée de l'invention.

20 La composition des différents milieux utilisés dans l'exemple est celle décrite dans le manuel distribué par la Société Invitrogen : « Multi Copy *Pichia Expression Kit* ».

La souche SMD1168 de *P. pastoris* (Réf. C 175-00-Invitrogen) est

25 transformée avec le plasmide pNIV5114, préalablement digéré par *Bg*/II, par la méthode des sphéroplastes.

Brièvement, les levures sont lavées successivement avec de l'eau, du milieu SED et du sorbitol 1M. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans le tampon SCE pour être digérées par la zymolyase

30 selon le protocole décrit dans le manuel Invitrogen. Les sphéroplastes sont récoltés par une centrifugation de 750g pendant 10min.

Après un lavage au sorbitol 1M, les sphéroplastes sont lavés avec le tampon CaS et transformés avec 10 μ g de pNIV5114 digéré par *Bg*/II. Les levures sont étalées sur un milieu gélosé RBD sur lequel est coulé de l'agar

35 mou RD.

Les transformants His+ sont étalés sur différentes boîtes YPD+Agar contenant des concentrations croissantes de G418 (de 0.5 à 4mg/ml) afin de sélectionner des levures possédant un grand nombre de copies du gène de E7Δ21-26. Après repiquage des colonies résistantes, l'expression de la 5 E7Δ21-26 est évaluée de la manière suivante.

Des précultures de certaines colonies sont réalisées dans le milieu BMGY (voir Invitrogen). Lorsque la DO_{600nm} atteint une valeur comprise entre 2-6, une partie de cette préculture est centrifugée et les cellules sont resuspendues dans le milieu BMMY contenant une concentration finale en 10 méthanol de 0.5%.

Le test d'induction de l'expression au méthanol peut se prolonger pendant plusieurs jours. Pour chaque intervalle de temps, des aliquotes sont prélevés. La présence de E7Δ21-26 dans le surnageant des cultures est visualisée en SDS-PAGE, après coloration au bleu de Coomassie ou 15 après Western blotting révélé avec un anticorps monoclonal anti-E7 (Santa Cruz, dilution 1000X).

Une Master Cell Bank du clone pNIV5114 n°1 est réalisée. Une Working Cell Bank, dérivée d'une ampoule de la MCB, est formée pour les productions de la E7Δ21-26 en bioréacteur.

20

1.3. Production de la protéine E7 mutée de l'invention à haut rendement, à l'échelle industrielle.

a)préculture :

100ml de milieu BMGY sont inoculés avec 150µl du glycérol de la 25 souche *P.pastoris* recombinante (incubation à 30°C pendant +/- 24h, vitesse d'agitation de 250rpm) afin de déterminer le temps de génération de la souche. 100ml de milieu BMGY sont inoculés avec xml de la préculture 1 pour obtenir une DO_{600nm} finale de +/- 30 au moment de l'inoculation du bioréacteur (incubation à 30°C pendant +/- 24h, vitesse d'agitation de 30 250rpm).

b)bioréacteur :

Le bioréacteur Bioflo III (New Brunswick) est rempli par 1,75 litre de Basalt [Salt Medium pH 5 contenant de l'anti-mousse (0.5ml) et des PTM₁ salts 35 (8ml) avant d'être inoculé par la préculture 2 (température de 30°C, vitesse

- d'agitation de 300rpm). L'oxygène dissous est maintenu à 20% grâce à une agitation comprise entre 300 et 1000rpm. Après +/- 18h de fermentation, le 1^{er} pic de consommation de l'oxygène dissous apparaît. A ce moment, 150ml de glycérol à 50% en poids sont ajoutés. Le pH du milieu est monté 5 de 5 à 6. +/- 3 heures plus tard, au moment du 2^{ème} pic de consommation de l'oxygène dissous, 10g de méthanol sont ajoutés et la concentration en méthanol est maintenue durant toute l'induction à 5g/litre (monitoring par un détecteur de méthanol, PTI Instruments). L'induction procède pendant 25-30h.
- 10 La biomasse est centrifugée pendant 30min à 1000rpm, le surnageant est filtré sur un filtre Sartopure PP2 (porosité 1.2µm).

c) Milieux utilisés

15 BMGY Medium

Yeast Extract 10g/L

Peptone 20g/L

Tampon Phosphate potassium 100mM pH6

YNB avec (NH₄)₂ SO₄ mais sans amino-acides (Invitrogen) 13.4g/L

20 Biotine 400µg/L

Glycérol 10ml/L

Basal Salts Medium

Acide phosphorique 85% 26.7 ml/L

25 Sulfate de calcium 0.93 g /L

Sulfate de potassium 18.2 g /L

Sulfate de Mg.7H₂O 14.9 g /L

Hydroxyde de potassium 4.13 g /L

Glycérol 40.0 g /L

PTM, Trace Salts

	Sulfate cuprique	5H ₂ O 6.0	g/L
	Iodure de sodium	0.08	g/L
5	Sulfate de manganèse	H ₂ O 3.0	g/L
	Molybdate de sodium.2H ₂ O	0.2	g/L
	Acide borique	0.02	g/L
	Chlorure de cobalt	0.5	g/L
	Chlorure de zinc	20.0	g/L
10	Sulfate ferreux	7H ₂ O 65.0	g/L
	Biotine	0.2	g/L
	Acide sulphurique	5.0	ml/L

1.4 Purification de la protéine E7 mutée selon l'invention

15 Le surnageant de culture est dilué 4 fois avec de l'eau et le pH de la solution est ensuite ajusté à pH7.5. Le mélange est directement appliqué sur une colonne de Q sépharose XL (2.6 x 12cm) conditionnée dans le tampon 20mM Tris-HCl pH7.5 à une vitesse de 30ml/min.

20 La colonne est ensuite lavée avec le tampon de conditionnement et avec le tampon contenant 400mM NaCl. La E7Δ21-26 est élueée de la colonne par l'application d'un gradient en NaCl de 400 à 650mM (15 volumes colonnes).

25 Les fractions contenant la E7Δ21-26 sont rassemblées, concentrées par ultrafiltration sur une membrane YM10 (Amicon) et appliquées sur une colonne de filtration moléculaire Superdex 200 (1.6 x 60cm) conditionnée dans le tampon PBS pH 7.2. Les fractions purifiées de E7Δ21-26 sont rassemblées.

Les endotoxines éventuelles des préparations de E7Δ21-26 sont ensuite éliminées par un traitement au Triton X-114. Les protéines sont dosées par le test Micro BCA (Pierce) et stockées à -20°C

30 La E7Δ21-26 se présente en SDS-PAGE sous la forme d'un doublet de bandes de 14 et 16kDa (Figure 1). Ces deux bandes sont immunoréactives. Des fractions aliquotes de E7Δ21-26 ont été incubées pendant 33 jours à 37°C. Nous n'observons pas de changements du comportement électrophorétique de l'échantillon (Figure 2). Ces résultats indiquent que la E7Δ21-26 est stable à cette température pendant au moins

1 mois. Le western blot confirme cette stabilité. La E7Δ21-26 est très stable également à -20 et +4°C (plusieurs mois).

La E7Δ21-26 possède un point isoélectrique acide compris entre 5 et 5,4 (Figure 3).

5

EXEMPLE 2 : Réponse immune (humorale et cellulaire) systémique

Exemple 2.1 : Activité immunogène de la protéine E7 Δ21-26 en présence d'adjuvant complet (ACF) et incomplet (AIF) de FREUND

10

L'activité immunogénique (humorale et cellulaire) de la préparation E7 Δ21-26, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2^b) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River, en présence de ACF et d'AIF.

15

A. Matériel et méthodes

Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml (50 µg) d'une émulsion en ACF par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J21 et J60.

20

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 8 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.
- 3 souris reçoivent 100 µg de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

25

Les souris sont challengées avec des cellules C3, 12 jours après la dernière immunisation. Les cellules C3, sont des cellules embryonnaires d'origine C57BL/6, transformées avec le génome HPV16 entier et l'oncogène ras (Feltkamp, M.C., H.L. Smits, M.P. Vierboom, R.P. Minnaar, B.M. de Jongh, J.W. Drijfhout, J. ter Schegget, C.J. Melief,

30

and W.M. Kast. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16- transformed cells. Eur.J.Immunol. 23:2242-2249.). Elles sont cultivées dans du milieu DMEM (Bio-Whittaker) additionné de 10% de FCS, 50 U/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine et 250 ng/ml de fungizone à 37°C dans une atmosphère humide contenant 7% de

CO₂. Les cellules destinées à être injectées aux souris sont lavées dans du milieu sans sérum après avoir été détachées du plastique à l'aide de trypsine.

- 5 L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.

B. Résultats :

- 10 Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26, en présence de ACF et d'AIF, ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

- 15 La réaction immunitaire est mesurée par :

1. Réponse humorale

- 20 La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

Figure 4 :

- 25 Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26, en présence de ACF et d'AIF, présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

30 L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 sont incubées pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN-γ pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF-α produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérum neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF-α,

alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

5

Figue 5

Les anticorps induits par la préparation E7 Δ21-26 en présence d'ACF puis d'AIF ont un pouvoir neutralisant très important.

10 **2. Réponse cellulaire**

2.1. Prolifération cellulaire

Les cellules spléniques des souris immunisées et des souris contrôles sont isolées puis cultivées dans des puits à fond rond d'une plaque de micro-culture à raison de 100 000 cellules/puits en présence de E7 natif. La culture cellulaire est poursuivie à 37 °C en atmosphère humide chargée à 5 % de CO₂ pendant 6 jours. 18 heures avant la fin de l'incubation, 0.5 µCi de thymidine tritiée/ puits sont ajoutés. L'intensité de la réponse immunitaire est proportionnelle à l'index de prolifération Ip.

20 $Ip = \text{cpm (coups par minute) pour l'antigène donné / cpm contrôle}$

Figure 6

25 Les cellules spléniques des souris immunisées avec la préparation E7 Δ21-26, en présence de ACF et d'AIF, prolifèrent, lorsqu'elles sont activées, *in vitro*, avec la protéine E7 native.30 **2.2. Production d'IFN-γ**

La présence d'IFN gamma dans les surnageants de culture des cellules spléniques cultivées en présence de 10 µg/ml de E7 natif est déterminée, après 72 heures de culture, à l'aide d'un test ELISA (LO-IMEX, Belgium) comme décrit précédemment (De Smedt, T., B. Pajak, E.

Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. J.Exp.Med. 184:1413-1424.) Les résultats sont exprimés en UI/ml.

5

Figure 7

Les cellules spléniques des souris immunisées avec la préparation E7 Δ21-26 en présence d'ACF puis d'AIF produisent une quantité importante d'IFN gamma lorsqu'elles sont activées, *in vitro*, avec la protéine 10 E7 native.

Exemple 2.2 : Activité immunogène de la protéine E7 Δ21-26 en présence d'adjuvant incomplet de FREUND (AIF)

15 L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7 Δ21-26, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2^b) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River, en présence d'AIF.

A. Matériel et méthodes

20 Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml (50 µg) d'une émulsion en AIF en présence de 1µg de GM-CSF murin et 1,5 µg d'IL-2 murin par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en AIF est donnée à J21 et J60.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur 25 chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.
- 3 souris reçoivent 100 µg de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

30

L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.

B. Résultats :

Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26 en présence d'AIF ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

5 Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

1. Réponse humorale

10 La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

Figure 8

Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 en présence d'AIF présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

20 L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités 25 par de l'IFN-γ pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF-α produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérum neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF-α, alors que les séums non neutralisants permettent la synthèse de cette 30 cytokine.

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

Figure 9

Les anticorps induits par la préparation E7 Δ21-26 en présence d'AIF ont un pouvoir neutralisant très important.

5 Exemple 2.3 : Activité immunogène de la protéine E7 Δ21-26
enchassée dans des nanoparticules de chitosan en présence
d'adjuvant incomplet de FREUND (AIF)

10 L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7 Δ21-26
enchâssée dans des nanoparticules de chitosan a été étudiée chez les
souris C57BL/6 (H-2^b) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez
Charles River, en présence d'AIF.

A. Matériel et méthodes

15 Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml (50 µg)
d'une émulsion en AIF en présence de 1µg de GMC-SF murin et 1,5 µg
d'IL-2 murin par voie intramusculaire. Une injection de rappel de 5 µg en
AIF est donnée à J21 et J60.

20 Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital est effectué sur
chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière
immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.
- 3 souris reçoivent 100 µg de la préparation et l'absence de symptômes de
maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

25 L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de
signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique
après autopsie.

B. Résultats :

30 Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26 enchâssée
dans des nanoparticules de chitosan en présence d'AIF ne présentent
aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne
manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

1. Réponse humorale

5 La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

10

Figure 10

Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 enchâssée dans des nanoparticules de chitosan en présence d'AIF présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

15

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN- γ pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF- α produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérums neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF- α , alors que les sérums non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

25

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

Figure 11

30

Les anticorps induits par la préparation E7 Δ21-26 enchâssée dans des nanoparticules de chitosan en présence d'AIF ont un pouvoir neutralisant très important.

Exemple 2.4 : Activité immunogène de la protéine E7 Δ21-26 en présence de QuilA

5 L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7 Δ21-26, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2^b) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River, en présence de QuilA

A. Matériel et méthodes

10 Des souris (groupes de 8) ont été injectées 2 fois en sous-cutané (s.c.) à la base de la queue avec 6.9 µg de E7Δ21-26 mélangées à 15 µg de l'adjuvant QuilA cf. p. 15 Brema tag Biosector, Danemark ou avec du QuilA seul, comme contrôle négatif (100 µl/injection, dans du PBS).

15 La réaction immunitaire est mesurée par :

1. Réponse humorale

20 La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA. Des plaques à 96 trous (F96 Maxisorp, Nunc, Roskilde Denmark) sont recouvertes avec la protéine His₆-E7, à 5 µg/ml dans du PBS, pendant une nuit à 4°C. Après lavage au PBS, les trous sont bloqués avec du PBS 1% BSA (bovine sérum albumine) (SIGMA) 1 h à 37°C. Les plaques sont encore lavées au PBS avant l'addition des sera, dilués successivement d'un facteur 5 dans du PBS 0.1% BSA, puis incubées une nuit à 4°C. Les anticorps monoclonaux anti-E7 HPV-TVG710Y (IgG2a) et ED17 (IgG1) (Santa-Cruz) sont utilisés comme standard. Après lavages au PBS, les IgG spécifiquement liées sont détectées avec un anticorps de mouton dirigé contre les IgG murines couplé à la peroxydase (Amersham) dilué 2000 fois dans du PBS 0.1% BSA. Des anticorps anti-isotypes, couplés à la peroxydase, (LO-IMEX, Belgium) sont utilisés pour détecter les IgG1 et les IgG2b anti-E7. Après 1 h d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées et l'activité peroxydase est

révélée et mesurée par une procédure classique (substrat o-phénylène diamine). Le titre en anticorps est exprimé par l'inverse de la dilution qui donne une valeur A_{490} égale à 0.6. La figure 12 représente les titres individuels d'IgG anti-E7 de 3 souris, pour trois expériences indépendantes

5

Figure 12

Une séroconversion a été détectée dans 89% (8/9) des souris traitées avec E721-26/QuilA. Les titres d'anticorps anti-E7 étaient variables d'une expérience à l'autre, mais aussi d'une souris à l'autre.

10

Le profil isotypique des réponses humorales anti-E7 a également été caractérisé. Le vaccin E721-26/QuilA induit la production d'IgG2b et d'IgG1 anti-E7.

15

Non seulement l'administration *in vivo* de la protéine E721-26 produite en *Pichia pastoris*, mélangée au QuilA, génère une réponse réponse immunitaire humorale anti-E7, mais aussi une réponse immune cellulaire.

20

2. Réponse cellulaire.

2.1. Prolifération cellulaire

Les rates de 3 souris traitées 2 fois avec le QuilA ou E721-26/QuilA ont été prélevées 2 semaines après la fin du traitement. Les cellules spléniques ont été isolées et suspendues dans du DMEM additionné de 1% de sérum normal de souris (Harlan), 50 IU/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, d'acides-aminés non essentiels, 2 mM de L-glutamine, 10 mM de Hepes et 5×10^{-5} M de 2-ME. Les cellules ont été distribuées dans des plaques à 96 trous à fond plat (500.000 par trou) et stimulées ou non avec les peptides (Eurogentec, Belgium) E7₄₉₋₅₇ (RAHYNIVTF) ou E7₄₁₋₆₂

(PAGQAEPDRAHYNIVTFCCCKCD) (Tindle, R.W., S. Croft, K. Herd, K. Malcolm, A.F. Geczy, T. Stewart, and G.J. Fernando. 1995. A vaccine conjugate of 'ISCAR' immunocarrier and peptide epitopes of the E7 cervical cancer-associated protein of human papillomavirus type 16 elicits specific Th1- and Th2-type responses in immunized mice in the absence of oil-based adjuvants. Clin.Exp.Immunol. 101:265-271) (9 µM), dérivés de E7.

La prolifération lymphocytaire a été mesurée à 48 et 72 h par un ajout de 0.4 µCi de thymidine tritiée dans les puits, suivi de 16 h de culture. Après lyse des cellules et filtration sur membrane en fibre de verre, la radioactivité incorporée à l'ADN a été mesurée dans du liquide de scintillation à l'aide d'un compteur .

2.2. Production d'IFN- γ

Après 72 h d'incubation à 37°C et 7% CO₂, du surnageant a été prélevé dans les puits, congelé à -70°C et testé pour son contenu en IFN- γ (Feltkamp, M.C., H.L. Smits, M.P. Vierboom, R.P. Minnaar, B.M. de Jongh, J.W. Drijfhout, J. ter Schegget, C.J. Melief, and W.M. Kast. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur.J.Immunol. 23:2242-2249.; Tindle, R.W., S. Croft, K. Herd, K. Malcolm, A.F. Geczy, T. Stewart, and G.J. Fernando. 1995. A vaccine conjugate of 'ISCAR' immunocarrier and peptide epitopes of the E7 cervical cancer-associated protein of human papillomavirus type 16 elicits specific Th1- and Th2-type responses in immunized mice in the absence of oil-based adjuvants. Clin.Exp.Immunol. 101:265-271.) L'IFN- γ a été quantifié par un test ELISA basé sur les anticorps monoclonaux F1 and Db-1 (LO-IMEX, Belgium) comme décrit précédemment.

Le vaccin E721-26/QuilA a généré la production d'IFN- γ comme le montre la figure 14.

Les splénocytes des souris immunisées ont produit 2 à 7 fois plus d'IFN- γ après stimulation avec les peptides E7 que dans le milieu (0.72 U/ml). La production spontanée d'IFN- γ par les splénocytes immuns était similaire à celle des splénocytes des souris traitées au QuilA, qu'ils soient stimulés ou non par E7 (0.83 et 0.71 U/ml, respectivement)

EXEMPLE 3 : Réponse immunitaire systémique et mucosale

Exemple 3.1 : Activité immunogène de la protéine E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 (SEPPIC)

10 L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7 Δ21-26, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2^b) femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River, en présence d'IMS 1113. (SEPPIC)

A. Matériel et méthodes

15 Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml contenant 50 µg de E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 avec 1µg de GM-CSF murin et 1,5 µg d'IL-2 murin par voie intramusculaire, ainsi que 20 µl contenant 20 µg de cette même préparation par voie intranasale.

20 Au jour 7, 14 et 21, ces souris reçoivent par voie intranasale 20 µl soit 20 µg de la préparation en IMS 1113.

Au jour 60, ces souris reçoivent une injection de 0.2 ml contenant 5 µg de la préparation en IMS 1113 et 20 µl contenant 20 µg de cette même préparation par voie intranasale.

25 Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital ainsi qu'un prélèvement des sécrétions vaginales est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.
- 3 souris reçoivent 100 µg de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.

B. Résultats :

Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

10 La réaction immunitaire est mesurée par :

1. Réponse humorale

1.1. Production d'anticorps d'isotype G dans les sérum

15 La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

Figure 15

20

Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

25

L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN-γ pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF-α produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérum neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF-α, alors que les sérum non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.

Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

Figure 16

5 1.2. Production d'anticorps d'isotype A dans les sécrétions vaginales

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgA dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

10

Figure 17

15 Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 en présence d'IMS 1113 présentent des titres d'anticorps de type IgA anti-E7 très importants.

20 Exemple 3.2 : Activité immunogène de la protéine E7 Δ21-26
enchâssée dans du chitosan en présence d'AIF (voie systémique) ou
en présence de PBS (voie nasale)

25 L'activité immunogénique (humorale) de la préparation E7 Δ21-26
enchâssée dans du chitosan, a été étudiée chez les souris C57BL/6 (H-2^b)
femelles, âgées de 6 semaines, achetées chez Charles River.

A. Matériel et méthodes

30 Au jour 0, un groupe de 6 souris reçoit une injection de 0.2 ml
contenant 50 µg de E7 Δ21-26 enchâssée dans du chitosan en présence
d'AIF avec 1µg de GM-CSF murin et 1,5 µg d'IL-2 murin par voie
intramusculaire, ainsi que 20 µl contenant 20 µg de cette même préparation
en présence de PBS additionnée d'1µg de GM-CSF murin et 1,5 µg d'IL-2
murin par voie intranasale.

 Au jour 7, 14 et 21, ces souris reçoivent par voie intranasale 20 µl
soit 20 µg de E7 Δ21-26 enchâssée dans du chitosan en présence de PBS.

Au jour 60, ces souris reçoivent une injection de 0.2 ml contenant 5 µg de la préparation en AIF et 20 µl contenant 20 µg de cette même préparation en présence de PBS par voie intranasale.

Un prélèvement sanguin au niveau rétro-orbital ainsi qu'un
5 prélèvement des sécrétions vaginales est effectué sur chaque souris avant la première injection à j-2 et 12 jours après la dernière immunisation.

- 6 souris contrôles reçoivent les mêmes préparations sans immunogène.
- 3 souris reçoivent 100 µg de la préparation et l'absence de symptômes de maladie est étudiée pendant les 7 jours suivant l'injection.

10

L'absence de toxicité de la préparation est mesurée par l'absence de signes cliniques : (comportement, poils, poids) et par examen anatomique après autopsie.

15 **B. Résultats :**

Les souris immunisées par la préparation E7 Δ21-26 enchaînée dans du chitosan ne présentent aucun signe clinique et aucune lésion anatomique.

20

Aucune des 3 souris immunisées avec 100 µg de la préparation ne manifeste de symptômes de maladie pendant les 7 jours suivant l'injection.

La réaction immunitaire est mesurée par :

25

1. Réponse humorale

1.1. Production d'anticorps d'isotype G dans les sérum

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgG dirigés contre la
30 protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

Figure 18

Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 enchâssée dans du chitosan présentent des titres d'anticorps de type IgG anti-E7 très importants.

- 5 L'activité neutralisante de ces anticorps a été mesurée à l'aide du test d'immunosuppression suivant. Une dilution au 1/50 du sérum prélevé à J-2 et J72 est incubée pendant 2 heures avec 50 ng/ml de E7 natif. Ces dilutions sont ensuite déposées sur des macrophages humains, prétraités par de l'IFN- γ pendant 16 heures. Après 24 heures de culture, les 10 surnageants de culture sont récupérés et la quantité de TNF- α produite est mesurée par un test ELISA, le DuoSet DTA 50 (R&D). Les sérum neutralisants empêchent la protéine E7 d'induire l'expression de TNF- α , alors que les sérum non neutralisants permettent la synthèse de cette cytokine.
- 15 Les résultats sont donnés en % de neutralisation.

Figure 19

- 20 1.2. Production d'anticorps d'isotype A dans les sécrétions vaginales

La présence dans le sérum d'anticorps de type IgA dirigés contre la protéine recombinante E7 native, est mesurée par ELISA et exprimée en titre (inverse de la dilution donnant une densité optique supérieure à 0.3)

25

Figure 20

- Les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26, enchâssée dans du chitosan, présentent des titres d'anticorps de type IgA anti-E7 très importants.

EXEMPLE 4 : Réponse anti-tumorale protectrice

- Exemple 4.1 : L'injection des protéines E7Δ21-26 en présence d'ACF 35 puis AIF génère une résistance anti-tumorale.

La mesure d'une réponse anti-tumorale protectrice chez les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 en présence d'ACF puis d'AIF (exemple 2.1) a été testée de la manière suivante.

12 jours après la dernière immunisation, les souris ont été injectées 5 avec 500.000 cellules C3, en sous-cutané (s-c) dans le flanc. Les cellules C3, sont des cellules embryonnaires d'origine C57BL/6, transformées avec le génome HPV16 entier et l'oncogène *ras* (2). La croissance tumorale est évaluée 1 fois par semaine par la mesure de la surface de la tumeur.

10

Figure 21

Une tumeur s'est développée chez toutes les souris contrôles traitées uniquement avec l'adjuvant. Parmi les 6 souris immunisées avec la préparation E7 Δ21-26 en présence d'ACF puis d'AIF :

15

- 4 souris n'ont développé aucune tumeur
- chez 1 souris, une tumeur s'est développée puis stabilisée
- chez 1 souris, une tumeur s'est développée

20

La protéine E7 Δ21-26 produite en *Pichia pastoris*, génère chez la souris, en présence de ACF et d'AIF, une réponse immune spécifique protectrice contre une tumeur induite par le papillomavirus humain de type 16.

25

Exemple 4.2 : L'injection des protéines E7Δ21-26 en présence de QuilA génère une résistance anti-tumorale.

La mesure d'une réponse anti-tumorale protectrice chez les souris immunisées avec la préparation de E7 Δ21-26 en présence de QuilA (exemple 2.4) a été effectuée de la manière suivante.

30

Deux semaines après la 2^{ème} administration des traitements, les souris ont été injectées avec 500.000 cellules C3, en s.c. dans le flanc. La

croissance tumorale est évaluée 1 fois par semaine par la mesure des 2 principaux diamètres de la tumeur. Le diamètre tumoral moyen est calculé.

Figure 22

5

Deux injections de E7Δ21-26/QuilA à trois semaines d'intervalle ont protégé, respectivement 87.5% (7/8) des souris C57BL6 contre la tumeur syngénique HPV16 positive. Une tumeur s'est développée chez toute les souris traitées au QuilA. La compilation des résultats de 3 expériences indépendantes à donné les résultats suivants : la vaccination E7Δ21-26/QuilA a protégé 91.6% (22/24), tandis que l'injection de QuilA n'a induit aucune résistance à C3 (0/24). Ces résultats montrent que les protéines recombinantes E7 de HPV16 produites en *P. pastoris*, délétée des acides aminés 21 à 26, génèrent une immunité anti-tumorale protectrice efficace.

15

EXEMPLE 5 : Réponse anti-tumorale thérapeutique

La capacité de la préparation E7Δ21-26/QuilA à induire le rejet de tumeurs C3 préimplantées a été testée de la manière suivante.

20

Exemple 5.1 : Mise en place du modèle thérapeutique

A. Matériel et méthodes

25

Des souris (groupes de 8) ont été injectées en s.c. dans le flanc avec un nombre croissant de cellules C3 : 0 ; 5.10^2 ; 5.10^3 ; 5.10^4 et 5.10^5 . La croissance tumorale est évaluée 1 fois par semaine par la mesure de la surface de la tumeur.

Résultats**TABLEAU I**

Evaluation de la croissance tumorale par la mesure de la
surface* des tumeurs

5

Nombre de cellules injectées	J0	J12	J17	J24	J31
0e + 0	0	0	0	0	0
5e + 2	0	0	0	0,1	1,9
5e + 3	0	0	0	0	2,8
5e + 4	0	0	0	10	6,9
5e + 5	0	25	202	sacrifiées	sacrifiées

* La surface, exprimée en mm^2 , représente la moyenne obtenue à partir de la mesure de surface de 8 tumeurs.

- 10 Les souris ayant reçu $5 \cdot 10^5$ cellules ont toutes développé une tumeur 12 jours après l'injection de cellules (8/8).
 Parmi les souris ayant reçu $5 \cdot 10^4$ cellules, 4 souris/8 ont développé une tumeur 21 jours après l'injection des cellules et 4 souris /8, 28 jours après l'injection.
- 15 Parmi les souris ayant reçu $5 \cdot 10^3$ cellules, 1 souris /8 a développé une tumeur 35 jours après l'injection des cellules, 3 souris /8, 42 à 60 jours après l'injection et les 4 autres souris ne présentent toujours pas de tumeur.
- 20 Parmi les souris ayant reçu $5 \cdot 10^2$ cellules, 1 souris /8 a développé une tumeur 35 jours après l'injection des cellules, les 7 autres souris n'ont toujours pas développé de tumeur.

Exemple 5.2 : Réponse anti-tumorale chez la souris ayant reçu une dose de 5.10^5 cellules C3

A. Matériel et méthodes

5

Des souris ont d'abord été injectées en s.c. dans le flanc avec 500.000 cellules C3 (jour 0). Les jours 2 et 7, les souris ont reçu une injection s.c. à la base de la queue de E7Δ21-26 (6.9 µg)/QuilA (15 µg) (n=8) ou QuilA (15 µg) (n=8) dans 100 µl de PBS. La taille des tumeurs a 10 été mesurée 2 fois par semaine comme décrit plus haut dans l'exemple 4.2.

B. Résultats

15

La figure 23 présente les résultats d'une expérience représentative.

Les injections de E7Δ21-26/QuilA ont induit un rejet total de la tumeur (1/8) ou une régression transitoire (7/8). Le vaccin E7Δ21-26/QuilA a significativement augmenté la durée de survie des animaux. Celle-ci a été calculée comme la moyenne du temps en jours auquel la tumeur a atteint 20 un diamètre tumoral moyen de 20 mm. Les 7 souris du groupe traité avec E7Δ21-26/QuilA, dont la tumeur a régressé transitoirement, ont eu une durée de vie moyenne de 42 ± 8 jours.

L'injection de E7Δ21-26/QuilA est capable d'induire une réponse 25 anti-tumorale thérapeutique. La durée de vie moyenne obtenue peut être cependant améliorée car dans cette expérience, une quantité saturante de cellules C3 ont été injectées (500 000 cellules).

Une quantité liminaire devrait être injectée, ce qui représenterait plus 30 la réalité. Ce nombre minimal devrait être de 10^4 cellules, comme nous le montre le modèle thérapeutique.

EXEMPLE 6 : COMPOSITION POUR VACCINATION ADN.Construction d'un vecteur d'expression pour une protéine chimérique li-E7Δ21-26 (5462 bp).

5 La séquence codant pour E7Δ21-26 a été synthétisée par PCR à partir du plasmide pcDNA.3 E7Δ21-26 (PTG6008, Transgène, Strasbourg, France) avec une amorce 5' contenant un site de clivage par BamHI (5'-GAG GGA TCC AAT CAT GCA TGG AGA TAC ACC TAC A-3') (SEQ ID N°6) et une amorce 3' contenant un site de clivage par XbaI (5'-GAG AGG
10 CTT CTA GAA GAT TAT GGT TTC TGA GAA CA-3') (SEQ ID N°7). Le produit PCR restant restreint par BamHI et XbaI a été purifié puis inséré dans un vecteur pcDNA.3zeo-li-E2 (6306 bp) préalablement délétré du fragment 5'-BamHI-XbaI-3' contenant la séquence codant pour E2. Le vecteur codant pour li-E2 a été construit comme suit : la séquence (249 nt)
15 codant pour les aa 1 à 80 de la chaîne invariante (li80), a été obtenue à partir du vecteur pMFG-li80-E7 (K. Thielemans et C. Heirman, VUB, Bruxelles, Belgique) par i) clivage par NcoI, ii) bluntage puis iii) coupure BamHI. La séquence codant pour E2 a été synthétisée par PCR à partir du génome HPV16 d'origine (Dürst et al., 1983, PNAS 80 :3812-3815) avec
20 une amorce 5' contenant un site de clivage par BamHI (5'-GAG GGA TCC AAT CAT GGA GAC TCT TTG CCA ACG T-3') (SEQ ID N°8) et 3' contenant un demi site de clivage par EcoRV (5'-ATC GAT TTG TCA TAT AGA CAT AAA TCC AGT-3') (SEQ ID N°9) , puis clivée avec BamHI. Les fragments li et E2 (1095 bp) ont été insérés dans pcDNA.3zeo (Invitrogen)
25 préalablement délétré du fragment BamHI-EcorV (35 nt).

REFERENCES

- AUSUBEL F M, Brent R. Kingstone Re, Moore DD, Seidman JG, Smith JA Struhl K editors , (1989), Current protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience.
- 5 • AUCOUTURIER et al., 2001, Vaccine, 19 : 2666-2672.
- BARAS et al., 1999, Infect. Immun., 67: 2643-2648.
- BASAK et al., 1995, J. Pept. Sci., 1(6): 383-395.
- CHEN et al., 1987, Mol. Cell. Biol. Vol.7: 2745-2752.
- 10 • CRUZ , I. et al., 1999, Br. J. Cancer, vol.81 ; 881-889.
- De Smedt, T., B. Pajak, E. Muraille, L. Lespagnard, E. Heinen, P. De Baetselier, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1996. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. J.Exp.Med. **184**:1413-1424.
- 15 • EL SHERIF AM et al., 2001, J. Pathol, **195**(2): 179-185
- FRANKEL et al., 1988, Cell, vol.55.
- Feltkamp, M.C., H.L. Smits, M.P. Vierboom, R.P. Minnaar, B.M. de Jongh, J.W. Drijfhout, J. ter Schegget, C.J. Melief, and W.M. Kast. 1993. Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide 20 protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. Eur.J.Immunol. **23**:2242-2249.
- FRALEY 1980, J. Biol. Chem., vol.255:10431.
- FLOTTE et al., 1992, Am. J. Respir. cell Mol. Biol., vol. 7: 349-356
- GAIT (ed.), 1984, Nucleic acid hybridization.
- 25 • GERARD C M, 2001, Vaccine, vol.19 : 2583-2589.
- GIANNINI et al., 1998, Clin. EXP. Immunol, **113**(2) : 183-189.
- GIANNINI ET AL., 2002, Int. J. CANCER , **97**(5) : 654-659.
- GOPAL 1985, Mol. Cell. Biol., vol.5: 1188-1190.
- GLOVER (ed.), 1985, DNA Cloning: A practical approach, vol. I and II. 30 Oligonucleotide synthesis, MRL Press, Ltd, Oxford, U.K.
- GRAHAM et al., 1973, Virology, vol.52: 456-457.

- Hallez, S., O. Detremmerie, C. Giannouli, K. Thielemans, T.F. Gajewski, A. Burny, and O. Leo. 1999. Interleukin-12-secreting human papillomavirus type 16-transformed cells provide a potent cancer vaccine that generates E7-directed immunity. *Int.J.Cancer* 81:428-437.
- 5 • HARLAND et al. , 1985, *J. Cell. Biol.* vol.101 :1094-1095.
- MCLAUGHLIN B A et al. , 1996, *Am. J. Hum. Genet* , vol.59:561-569.
- MUDERSPACH L. et al., 2000, *Clinical Cancer Research*, vol.6: 3406-3416.
- N ICOLAU et al. , 1987, *Methods enzymol.*, vol.149: 157-176.
- 10 • OSEN W et al., 2001, *Vaccine*, vol.19: 4276-4286.
- POTTER et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, vol.81 (22): 7161-7165.
- SAMBROOK J FRITSCH E F et MANIATIS T, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor , New York .
- 15 • SAMULSKI et al. 1989, *J. Virol.* , vol.63 :3822-3828.
- SCHOELL W M J, 1999, *Gynecologic Oncology*, vol.74: 448-455.
- SEEDORF K, 1985, *Virology*, vol. 145 (1): 181-185.
- SKAUGRUD et al. 1999, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.*, 16: 23-40.
- 20 • TACSON et al., 1996, *Nature Medicine*, vol.2 (8) : 888-892.
- TUR-KASPA, 1986, *Mol. Cell. Biol.*, vol.6: 716-718.
-
- 25 • TINDLE, R.W., S. Croft, K. Herd, K. Malcolm, A.F. Geczy, T. Stewart, and G.J. Fernando. 1995. A vaccine conjugate of 'ISCAR' immunocarrier and peptide epitopes of the E7 cervical cancer-associated protein of human papillomavirus type 16 elicits specific Th1- and Th2-type responses in immunized mice in the absence of oil-based adjuvants. *Clin.Exp.Immunol.* 101:265-271.
- HUYGEN et al., 1996, *Nature Medicine*, vol.2 (8) : 893-898.

REVENDICATIONS

1. Produit d'expression d'un ADN codant une protéine E7 mutée du Papillomavirus HPV-16, caractérisée en ce que ladite protéine comprend la 5 séquence en acides aminés SEQ ID N°1.
2. Acide nucléique codant la protéine E7 mutée selon la revendication 1, ou acide nucléique de séquence complémentaire.
- 10 3. Acide nucléique selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide régulateur contrôlant l'expression de la protéine E7 mutée dans une cellule hôte procaryote ou eucaryote.
4. Acide nucléique selon la revendication 3, caractérisé en ce que ledit 15 polynucléotide régulateur contrôle l'expression de la protéine E7 mutée dans une cellule de levure.
5. Cassette d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 3 et 4.
- 20 6. Cassette d'expression selon la revendication 5, comprenant en outre un polynucléotide marqueur de sélection.
7. Vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un acide 25 nucléique selon l'une des revendications 1 à 4 ou une cassette d'expression selon l'une des revendications 5 et 6.
8. Cellule hôte transformée par un acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 4, une cassette d'expression selon l'une des 30 revendications 5 et 6, ou un vecteur recombinant selon la revendication 7.

9. Cellule hôte transformée selon la revendication 8, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule de levure.
10. Composition comprenant le produit d'expression d'un ADN codant la protéine E7 mutée selon la revendication 1.
 - 5
11. Composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, le produit d'expression d'un ADN codant la protéine E7 mutée selon la revendication 1, le cas échéant en association avec un ou plusieurs excipients physiologiquement compatibles.
 - 10
12. Composition immunogène comprenant, à titre de principe actif, le produit d'expression d'un ADN codant la protéine E7 mutée selon la revendication 1, le cas échéant en association avec un ou plusieurs excipients ou adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.
 - 15
13. Composition vaccinale préventive ou curative d'un cancer provoqué par une infection à *Papillomavirus*, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre de principe actif, le produit d'expression d'un ADN codant la protéine E7 mutée selon la revendication 1, en association avec un ou plusieurs adjuvants de l'immunité physiologiquement compatibles.
 - 20
14. Composition vaccinale selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps neutralisant l'activité immunosuppressive de la protéine E7 native.
 - 25
15. Composition vaccinale selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgA.
 - 30

16. Composition vaccinale selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production, d'anticorps d'isotype IgG.
5
17. Composition vaccinale selon la revendication 14, caractérisée en ce qu'elle comprend la combinaison (i) d'un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production d'anticorps d'isotype IgA et (ii) d'un adjuvant susceptible d'orienter préférentiellement la réponse immunitaire vers la production, d'anticorps d'isotype IgG.
10
18. Composition vaccinale selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un adjuvant de l'immunité susceptible d'induire une réponse immunitaire humorale et cellulaire.
15
19. Composition vaccinale selon la revendication 18, caractérisée en ce que la réponse cellulaire est caractérisée notamment par la prolifération de lymphocytes T exprimant l'antigène CD8 et reconnaissant spécifiquement la protéine E7 sauvage.
20
20. Composition vaccinale préventive ou curative d'un cancer provoqué par une infection par HPV-16, caractérisée en ce qu'elle comprend une quantité immunologiquement efficace d'un acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 4, d'une cassette d'expression selon l'une des revendications 5 et 6 ou d'un vecteur recombinant selon la revendication 7.
25
21. Procédé pour la production du produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée du Papillomavirus HPV-16 dans une cellule de levure, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
30

- a) Transformation d'une culture de cellules de levure du genre *Pichia pastoris* avec un vecteur recombinant selon la revendication 7 ;
- b) Sélection des cellules de levures transformées par le vecteur ;
- c) Culture des cellules transformées sélectionnées à l'étape b) ;
- 5 d) Purification du produit d'expression à partir du surnageant de culture obtenu à l'issue de l'étape c).

22. Anticorps neutralisants dirigés contre le produit d'expression de l'ADN codant la protéine E7 mutée selon la revendication 1.

10

23. Composition pour vaccination passive à l'encontre d'une infection par HPV-16 contenant des anticorps selon la revendication 22.

1/16

Figure 1

kDa
97 _____
68 _____
43 _____

29 _____
18 _____
14 _____

Figure 2

kDa
97 _____
68 _____

To 32 33 jours

43 _____
29 _____
18 _____
14 _____

2/16

Figure 3

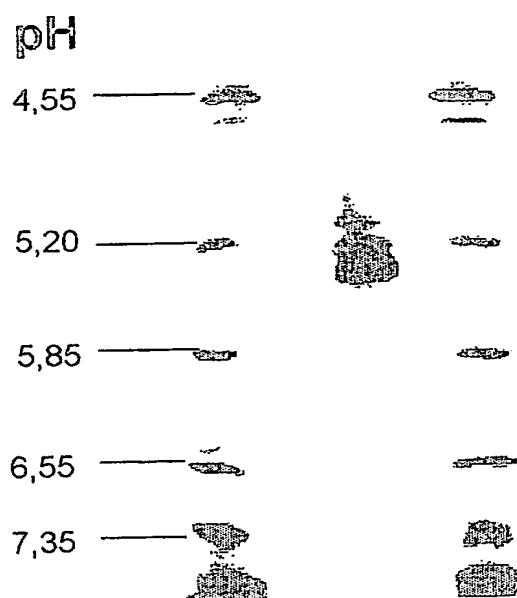


Figure 4

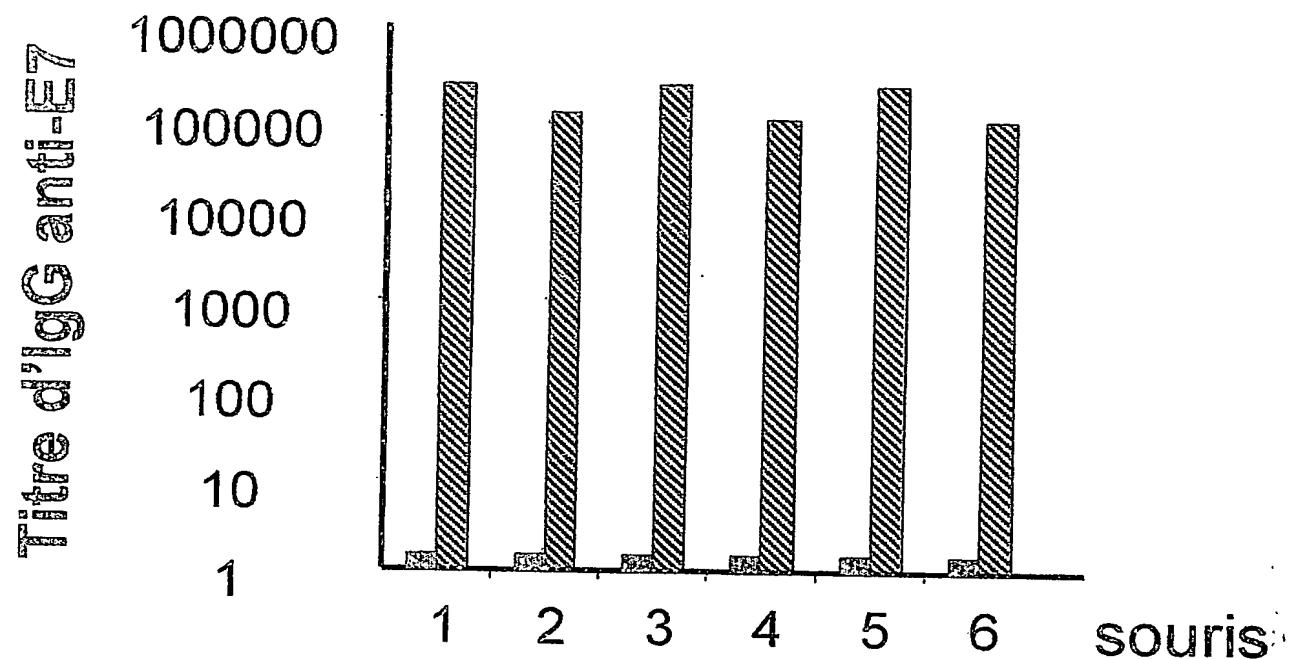
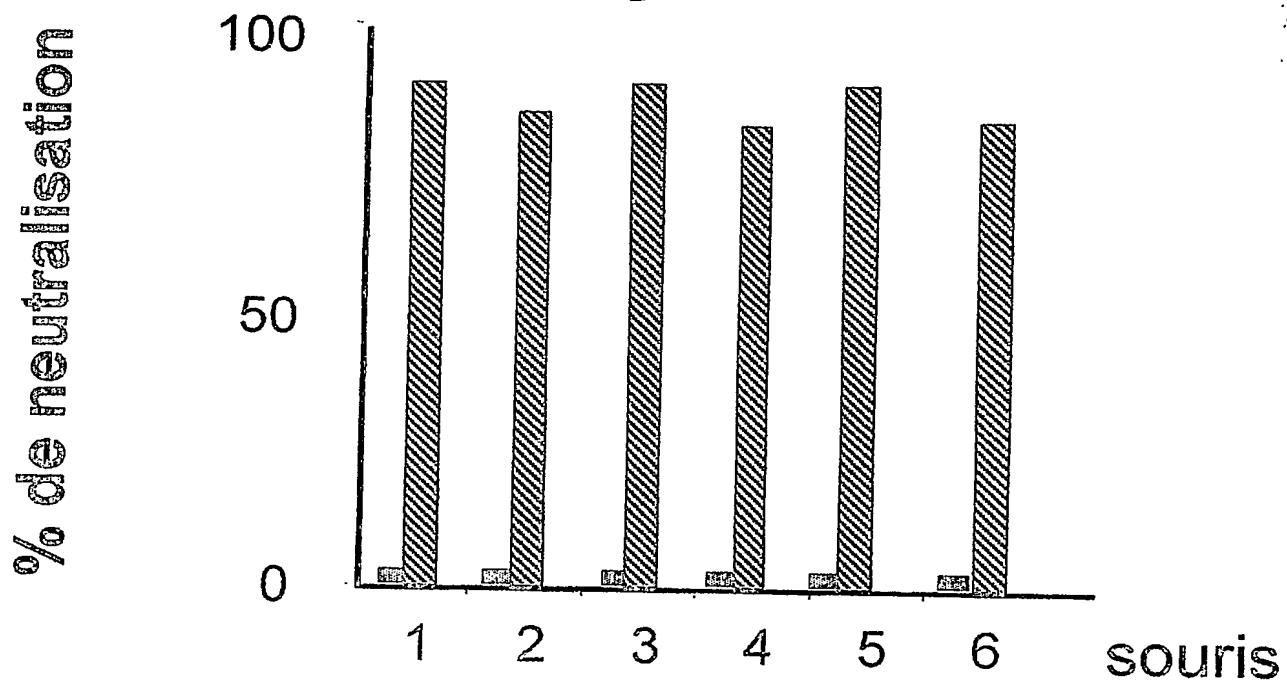


Figure 5



■ Avant immunisation

■ Après immunisation

Index de prolifération

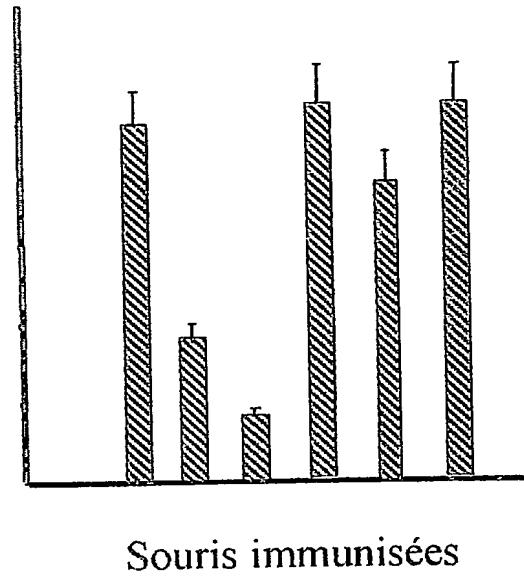
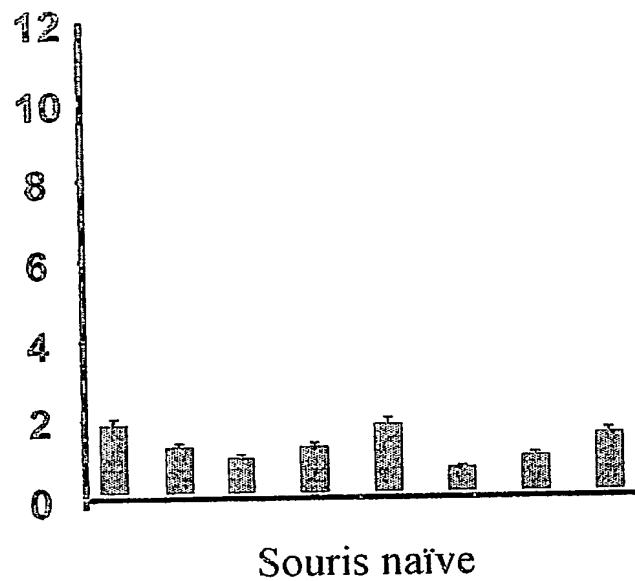


Figure 7

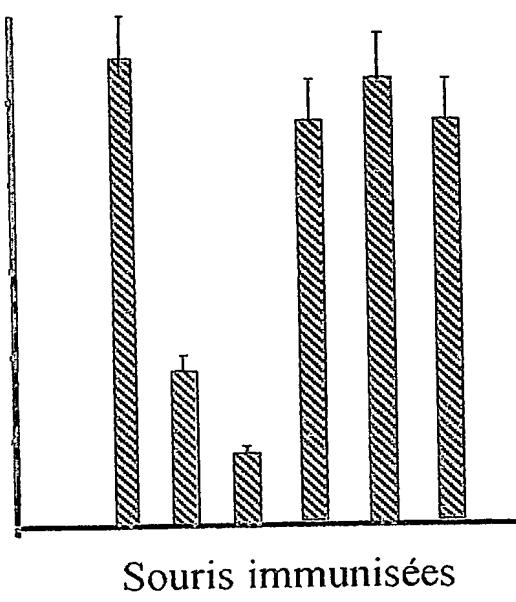
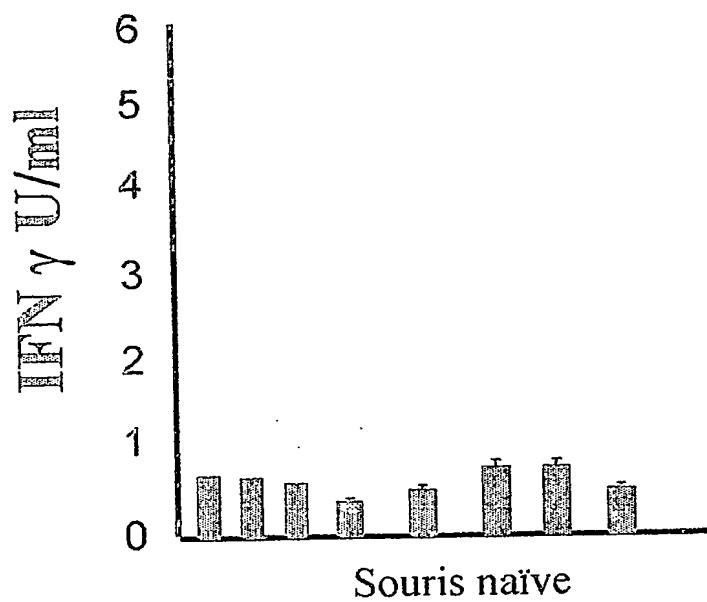


Figure 8

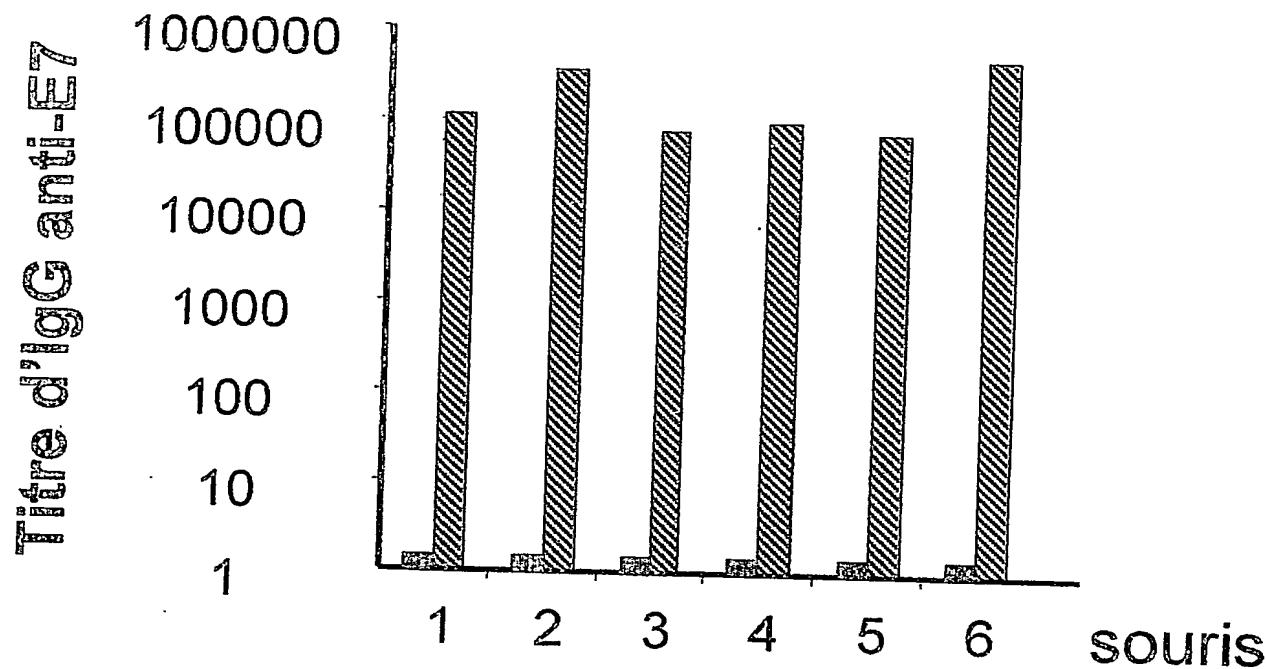
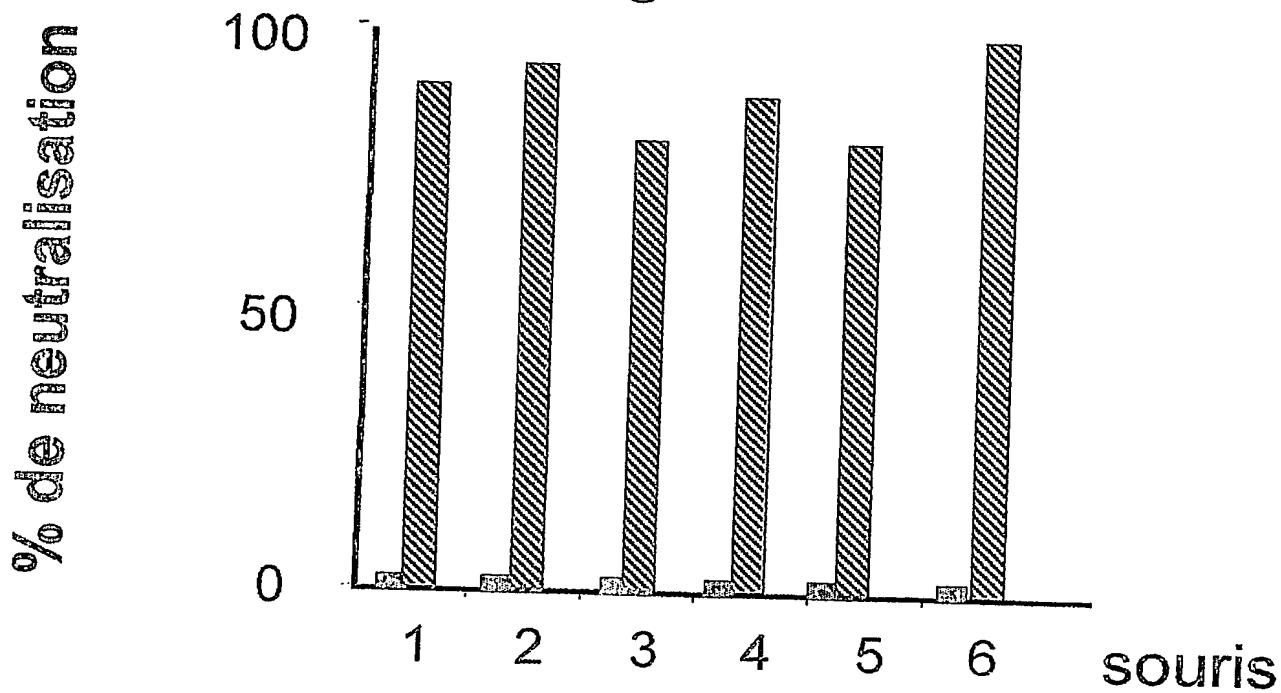


Figure 9



■ Avant immunisation

■ Après immunisation

Figure 10

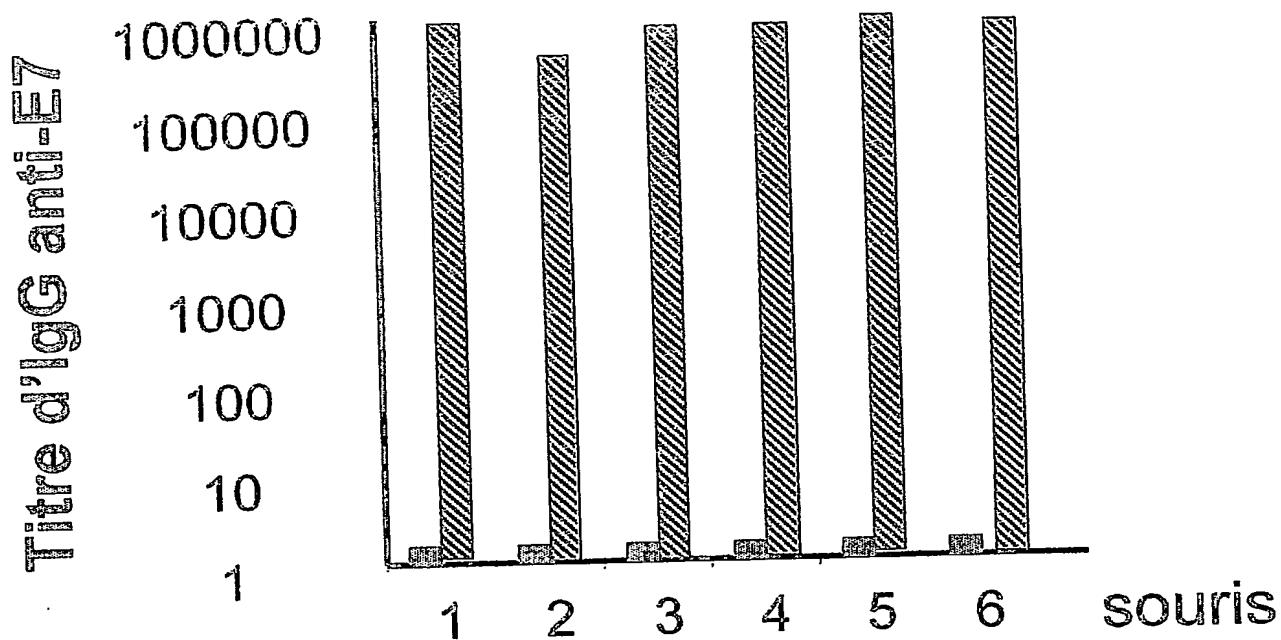
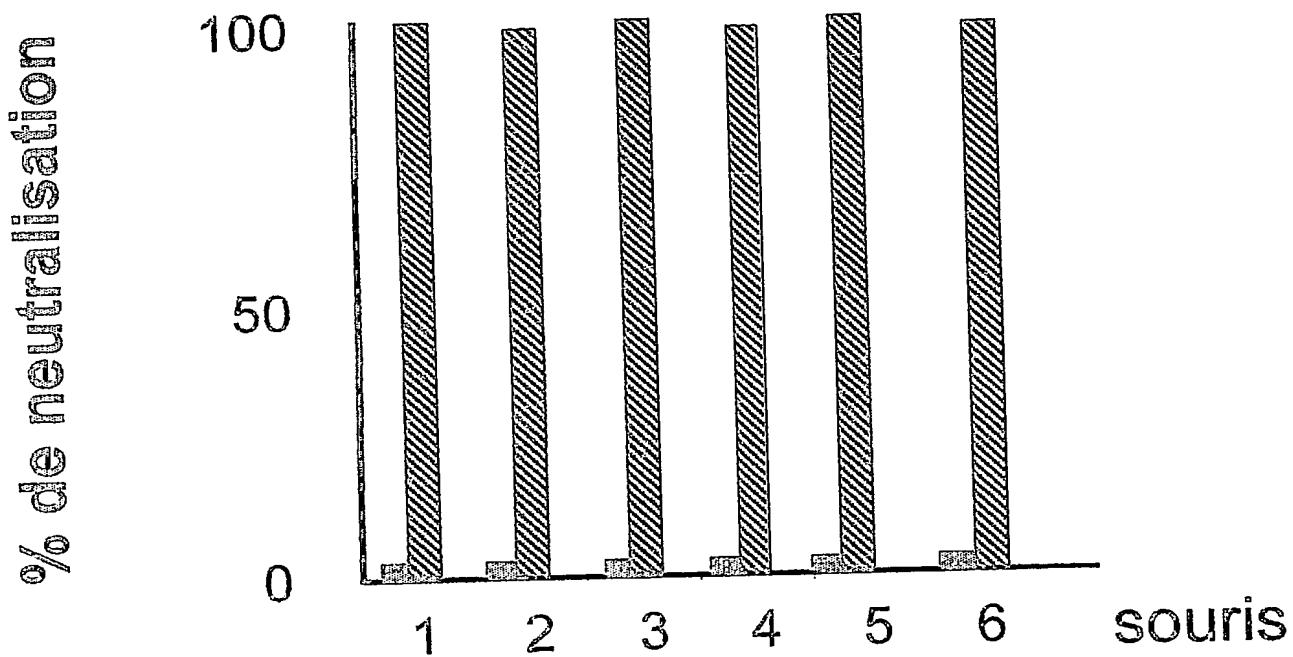


Figure 11

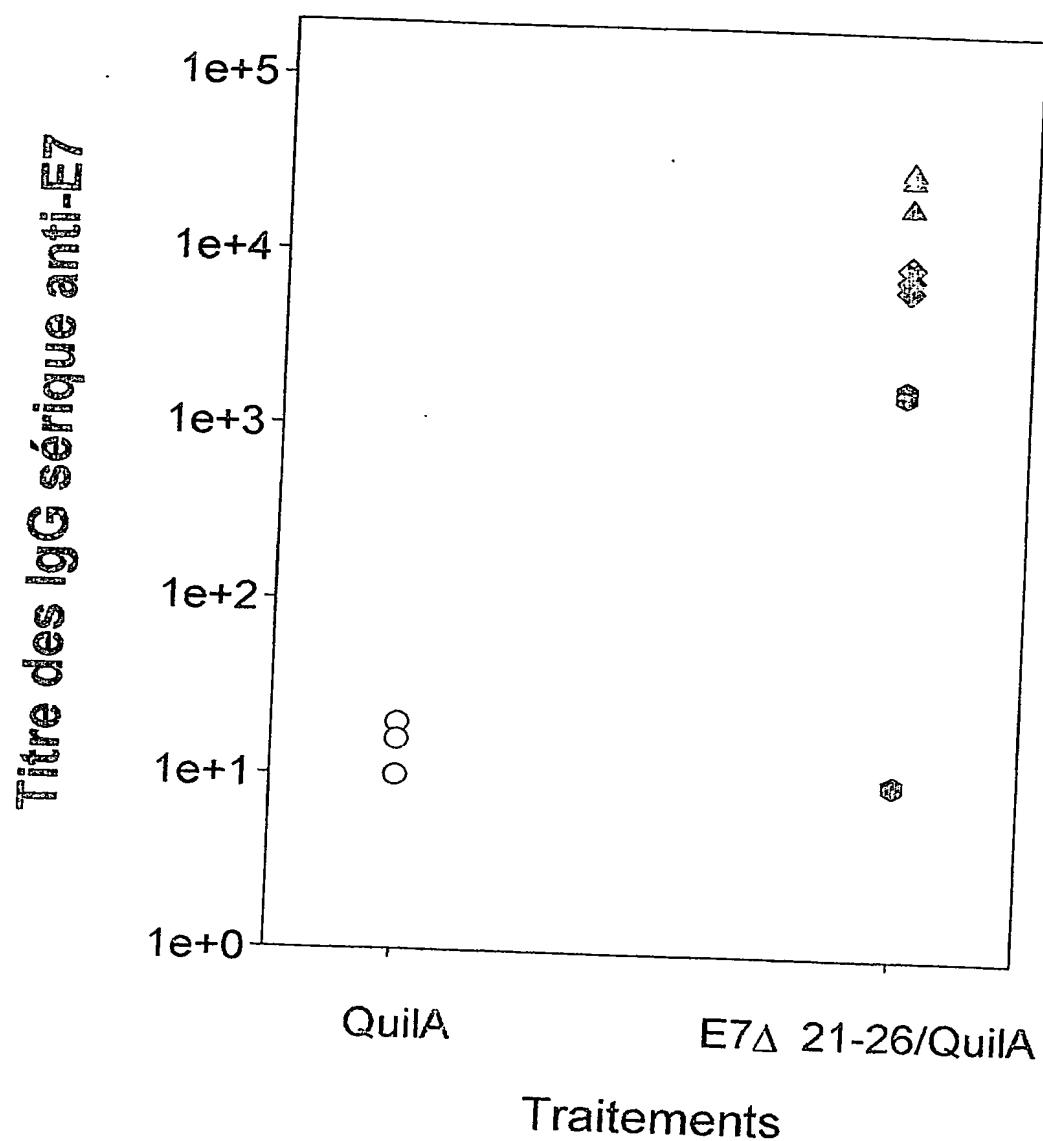


■ Avant immunisation

▨ Après immunisation

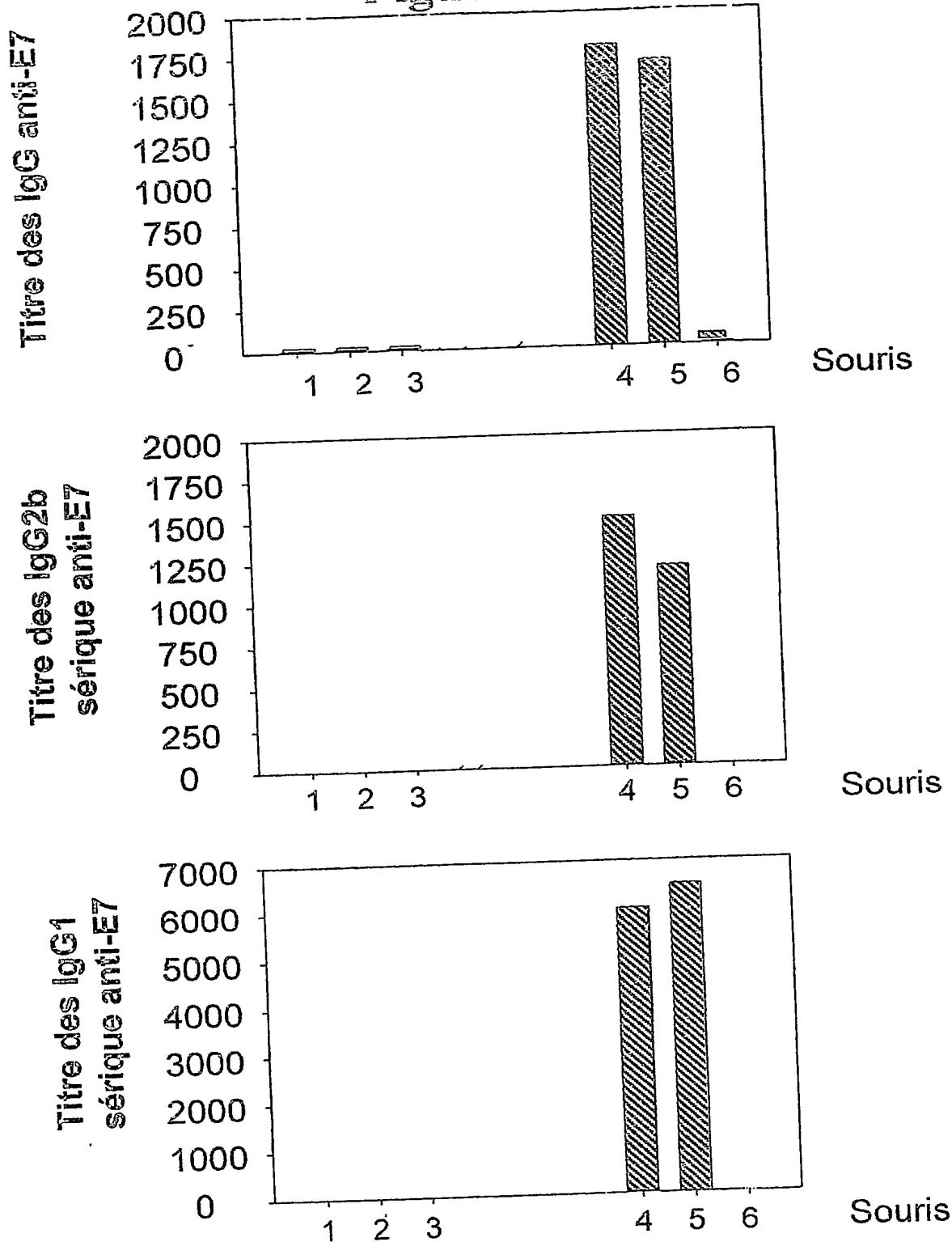
7/16

Figure 12



8/16

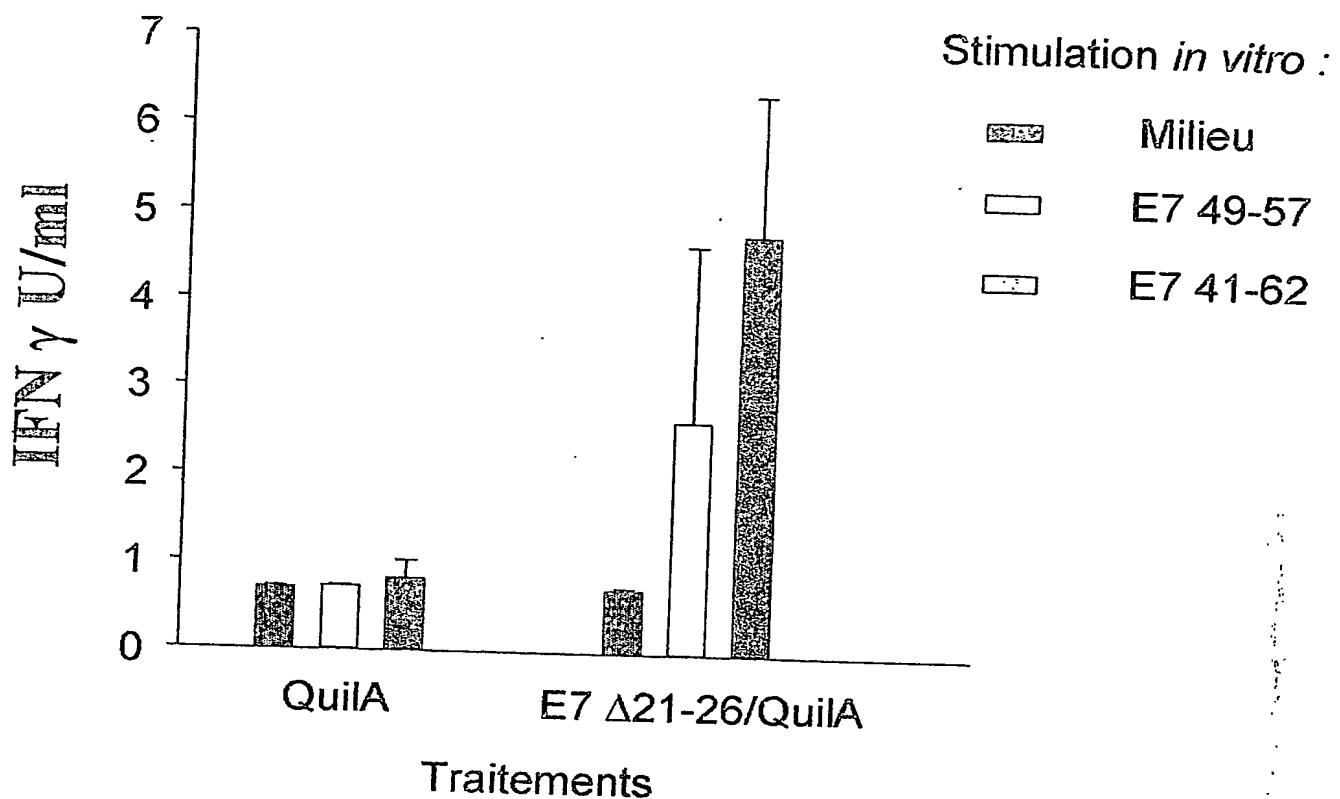
Figure 13



Traitements : 1-3 QuilA ; 4-6 E7 Δ 21-26/QuilA

9/16

Figure 14



10/16

Figure 15

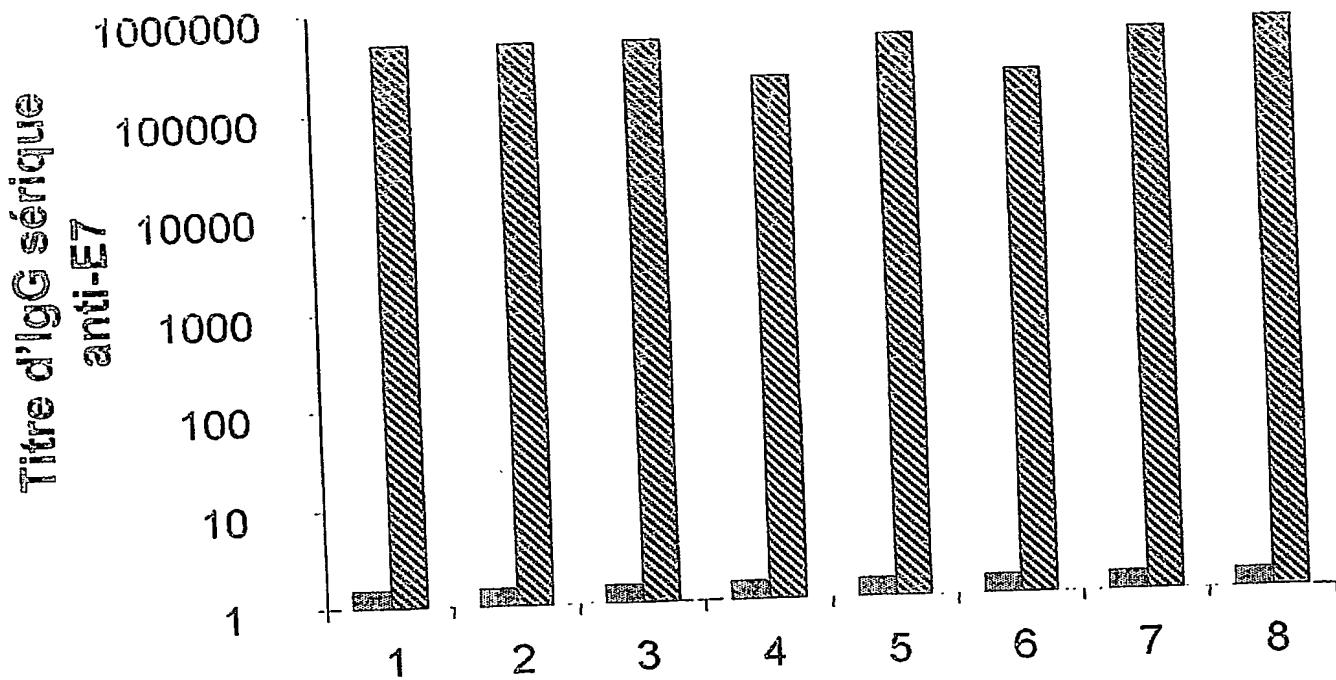
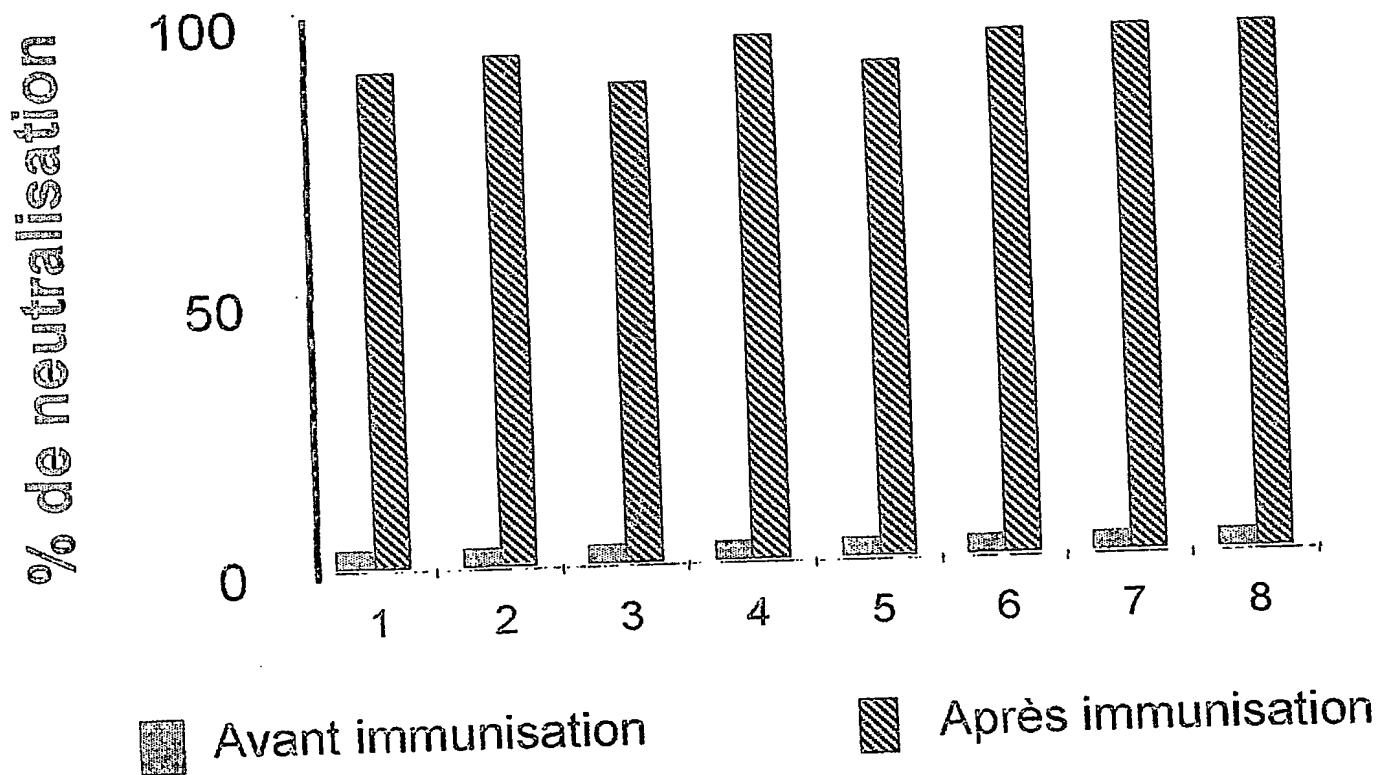
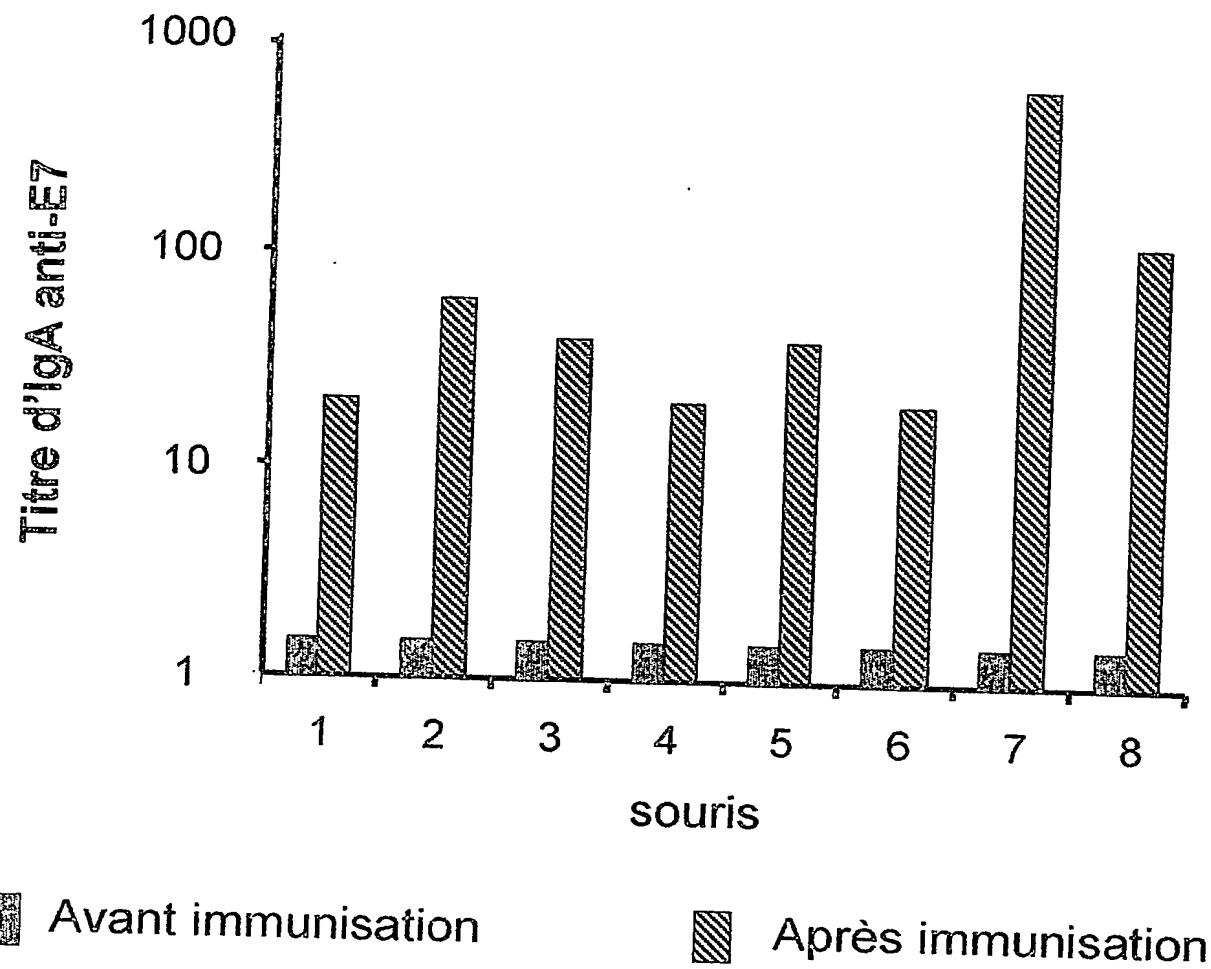


Figure 16



11/16
Figure 17



12/16

Figure 18

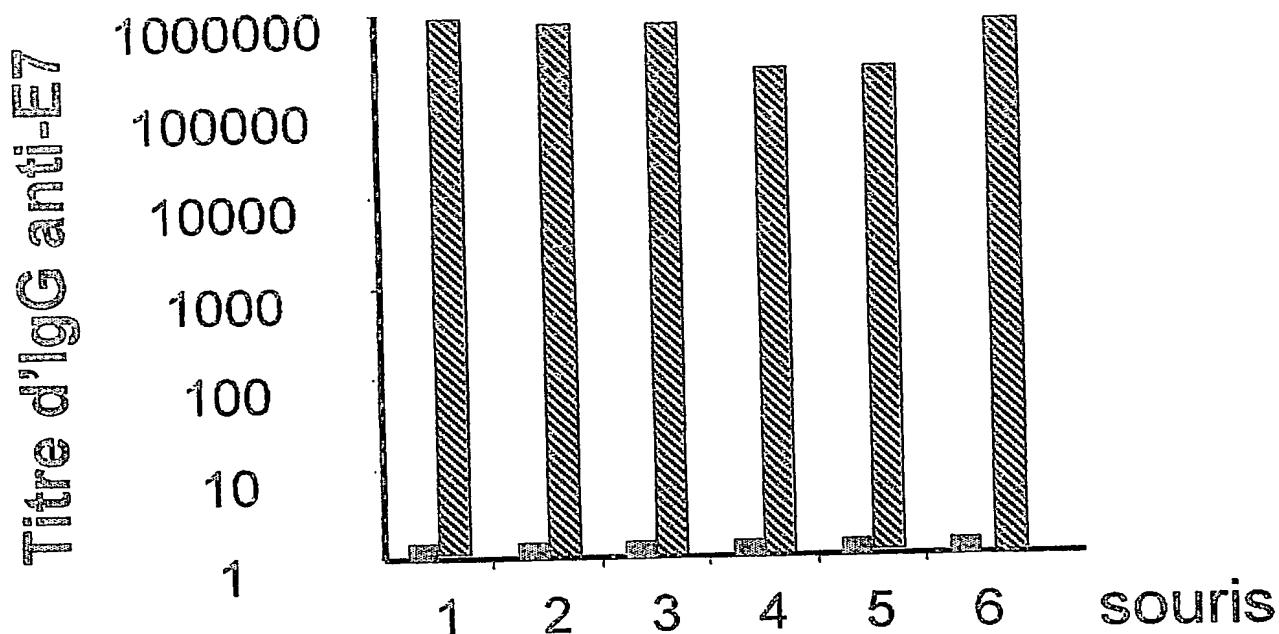
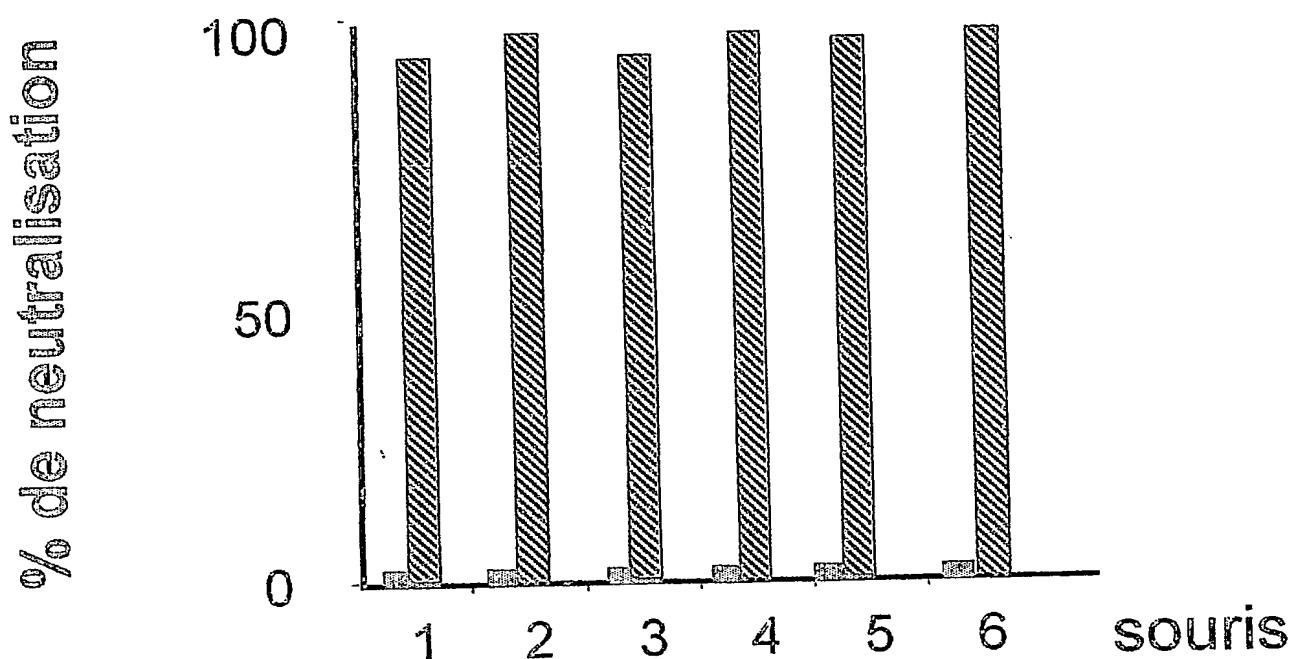


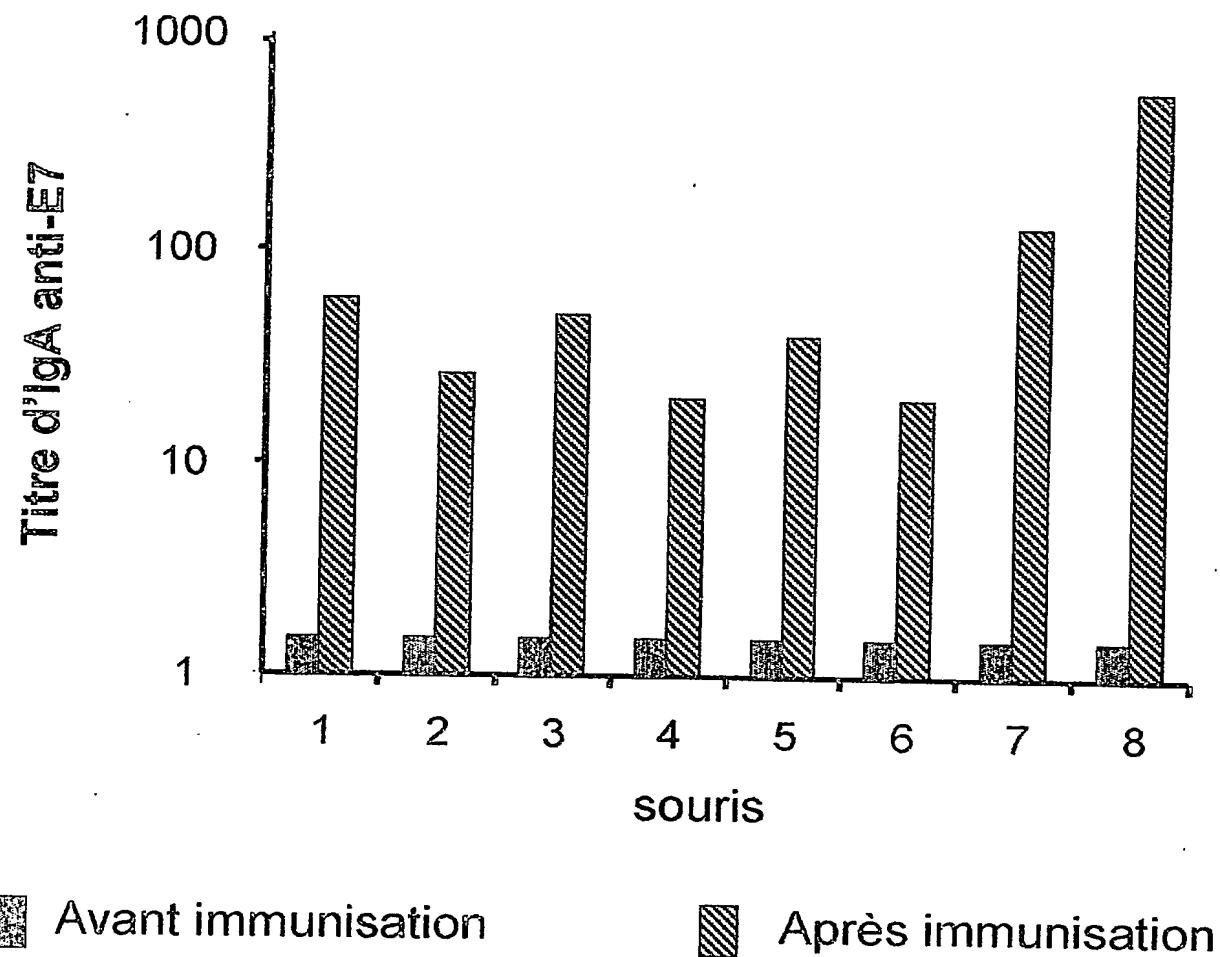
Figure 19



■ Avant immunisation

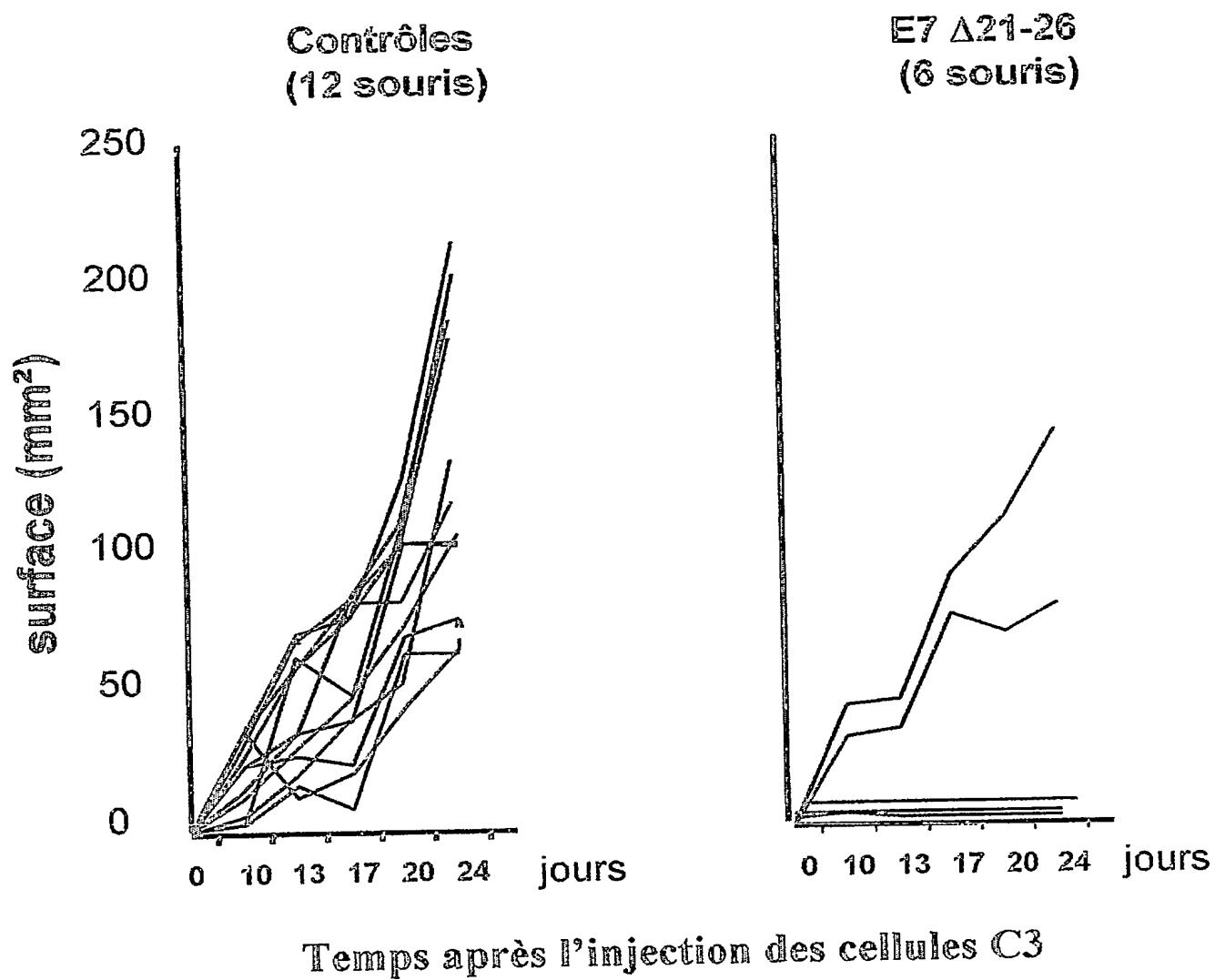
■ Après immunisation

Figure 20



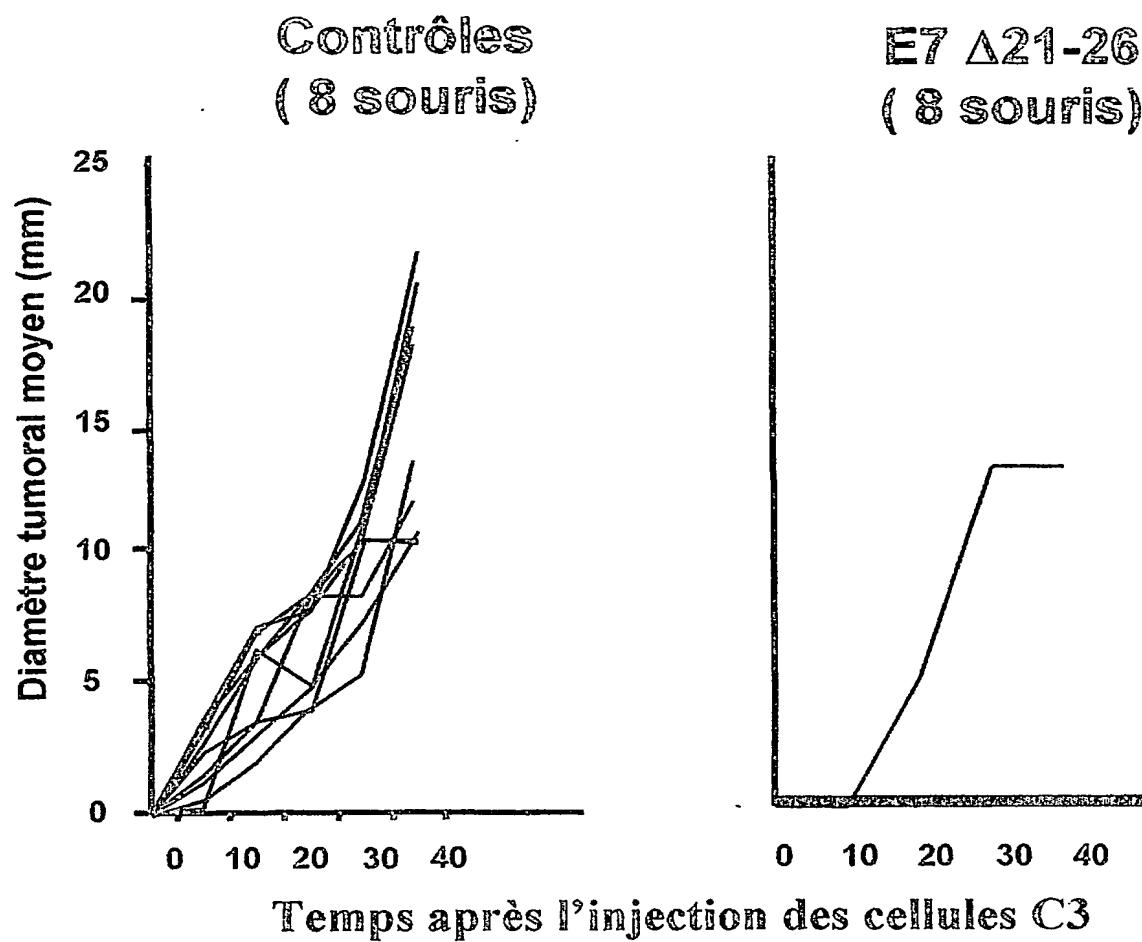
14/16

Figure 21



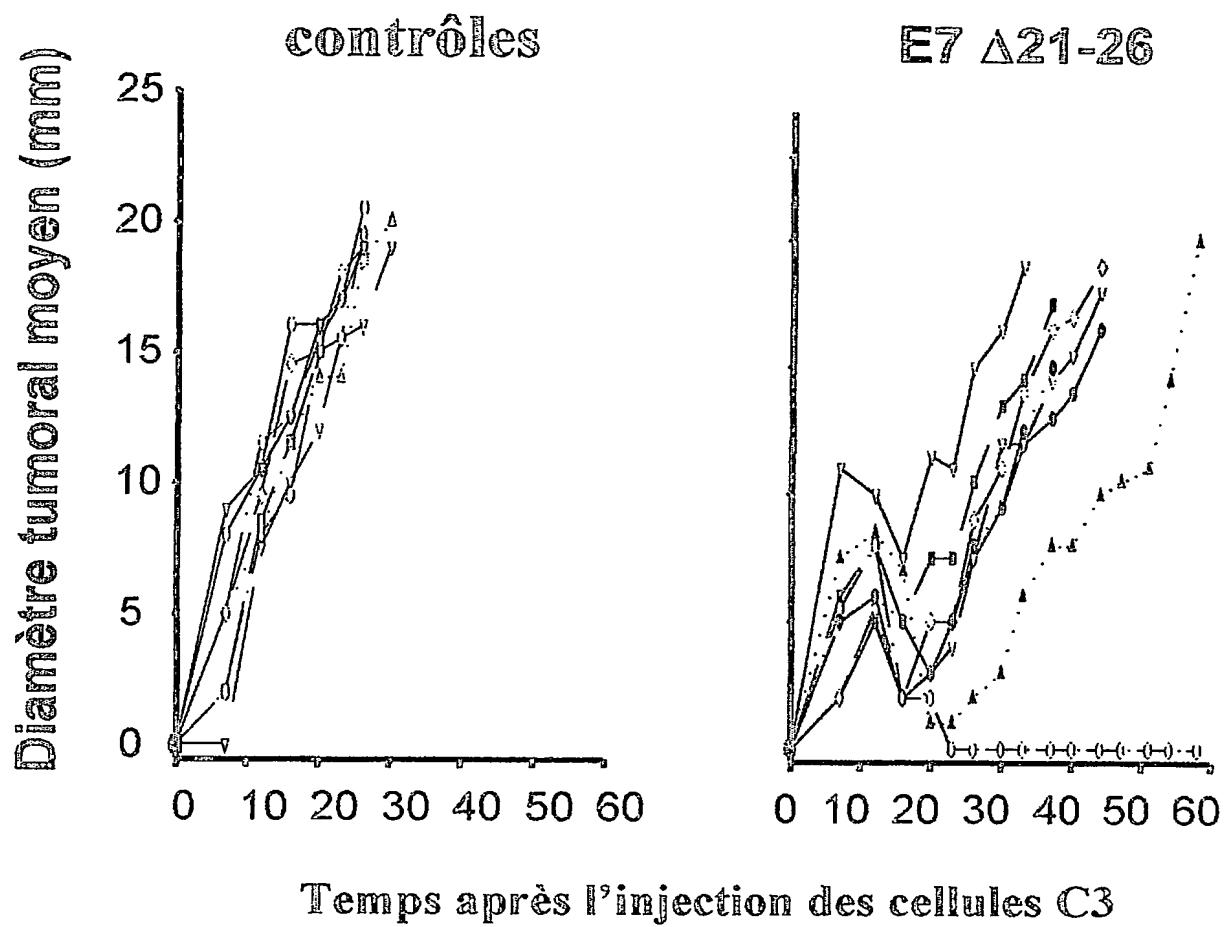
15/16

Figure 22



16/16

Figure 23



LISTE DE SEQUENCES

<110> NEOVACS

<120> Protéine E7 mutée de HPV-16, composition immunogène
contenant ladite protéine et son procédé de préparation

<130> Neovacs-E7 mutee

<140>
<141>

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:E7-delta-21-26

<400> 1

Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15Pro Glu Thr Thr Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile
20 25 30Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile
35 40 45Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln
50 55 60Ser Thr His Val Asp Ile Cys Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr
65 70 75 80Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Arg Lys Pro
85 90

<210> 2

<211> 276

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:E7-delta-21-26

<400> 2

catggagata cacctacatt gcatgaatat atgttagatt tgcaaccaga gacaactcaa 60
ttaaatgaca gctcagagga ggaggatgaa atagatggtc cagctggaca agcagaaccg 120
gacagagccc attacaatat tctaacccttt tggatcgaaat gtgactctac gcttcgggttg 180
tgcgtacaaa gcacacacgt agacattcgt actttggaag acctgttaat gggcacacta 240
ggaatttgtt gccccatctg ttctcagaaa ccataa 276

<210> 3	
<211> 38	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de la séquence artificielle:amorce	
<400> 3	
gagaaaagag aggctgaagc tcatggagat acacctac	38
<210> 4	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de la séquence artificielle:amorce	
<400> 4	
gcaaccagag acaactcaat taaatgacag ctcag	35
<210> 5	
<211> 42	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de la séquence artificielle:amorce	
<400> 5	
gttctcagaa accataatga attcatgttt caggacccac ag	42
<210> 6	
<211> 33	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de la séquence artificielle:amorce	
<400> 6	
gagggatcca atcatgcattg gagatacacc tac	33
<210> 7	
<211> 35	
<212> ADN	
<213> Séquence artificielle	
<220>	
<223> Description de la séquence artificielle:amorce	
<400> 7	
gagaggcttc tagaagatta tggtttctga gaaca	35

<210> 8
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 8
gaggatggatcca atcatggaga ctctttgcac acgt

34

<210> 9
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:amorce

<400> 9
atcgatttgt catatagaca taaatccagt

30



BREVET D'INVENTION

Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	N729FR
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	0205173
TITRE DE L'INVENTION	
	PRODUIT D'EXPRESSION D'UN ADN CODANT UNE PROTEINE E7 MUTEE DE HPV-16, COMPOSITION IMMUNOGENE CONTENANT LEDIT PRODUIT D'EXPRESSION ET SON PROCEDE DE PREPARATION

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	BIZZINI
Prénoms	Bernard
Rue	65, rue Roc
Code postal et ville	81000 ALBI - FRANCE
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	BOLLEN
Prénoms	Alex
Rue	Gaasbeek straat, 65
Code postal et ville	1701 ITTERBEEK - BELGIQUE
Société d'appartenance	
Inventeur 3	
Nom	BURNY
Prénoms	ARSENE
Rue	65, Chaussée de Namur
Code postal et ville	5030 GEMBLOUX - BELGIQUE
Société d'appartenance	
Inventeur 4	
Nom	COHEN
Prénoms	Paul
Rue	21, quai de Bourbon
Code postal et ville	75004 PARIS - FRANCE
Société d'appartenance	
Inventeur 5	
Nom	HALLEZ
Prénoms	Sophie
Rue	Rue d'Odenge, 40
Code postal et ville	1360 ORBAIS - BELGIQUE
Société d'appartenance	

Inventeur 6

Nom	JACQUET
Prénoms	Alain
Rue	Avenue Daniel Boon, 109
Code postal et ville	1160 BRUXELLES - BELGIQUE
Société d'appartenance	

Inventeur 7

Nom	LE BUANEC
Prénoms	Hélène
Rue	29, rue Poliveau
Code postal et ville	75005 PARIS - FRANCE
Société d'appartenance	

Inventeur 8

Nom	ZAGURY
Prénoms	Daniel
Rue	1, Avenue Frederic Le Play
Code postal et ville	75007 PARIS - FRANCE
Société d'appartenance	

DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE	28 JUIN 2002
--	--------------

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.



CATHERINE Alain
C.P.I. bm (92-1045 i)
Cabinet HARLE ET PHELIP